

MICROALGAS DE ÁGUAS CONTINENTAIS
VOLUME 1

POTENCIALIDADES E DESAFIOS DO CULTIVO

DIVA SOUZA ANDRADE
ARNALDO COLOZZI FILHO
EDITORES



COPEL

Pura Energia



CARLOS ALBERTO RICHA
Governador do Estado do Paraná

NORBERTO ANACLETO ORTIGARA
*Secretário de Estado da Agricultura
e do Abastecimento*

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR

FLORINDO DALBERTO
Diretor-Presidente

ARMANDO ANDROCIOLI FILHO
Diretor de Pesquisa

ALTAIR SEBASTIÃO DORIGO
Diretor de Administração e Finanças

ADELAR ANTONIO MOTTER
Diretor de Gestão de Pessoas

MARCOS VALENTIN FERREIRA MARTINS
Diretor de Inovação e Transferência de Tecnologia

COPEL GERAÇÃO E TRANSMISSÃO S.A.

SERGIO LUIZ LAMY
Diretor-Presidente

ANTONIO SERGIO DE SOUZA GUETTER
Diretor de Finanças

CEZAR MONTEIRO PIRAJÁ JUNIOR
Diretor Adjunto

MICROALGAS DE ÁGUAS CONTINENTAIS
———— VOLUME 1 ————

POTENCIALIDADES E DESAFIOS DO CULTIVO

DIVA SOUZA ANDRADE
ARNALDO COLOZZI FILHO
EDITORES



INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ
Londrina
2014



INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ

EDITOR EXECUTIVO

Álison Néri

REVISÃO

DIAGRAMAÇÃO

IMPRESSÃO

Midiograf

DISTRIBUIÇÃO

Área de Difusão de Tecnologia - ADT

adt@iapar.br | (43) 3376-2373

TIRAGEM: 1.000 exemplares

Trabalho realizado em parceria com a Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio (FAPEAGRO).



Todos os direitos reservados.

É permitida a reprodução parcial, desde que citada a fonte.

É proibida a reprodução total desta obra.

Esta publicação, *Microalgas de Águas Continentais: Potencialidades e Desafios do Cultivo*, é o primeiro volume de um conjunto de três, que foram escritos como parte das atividades do *Projeto Microalgas*. Este projeto de pesquisa foi desenvolvido por meio de parceria firmada entre o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), a Companhia Paranaense de Energia (COPEL) e a Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio (FAPEAGRO), durante os anos de 2009 a 2014, com o objetivo de estudar as microalgas como fonte alternativa de energia e de coprodutos de valor agregado com possibilidades de aplicações biotecnológicas. As publicações apresentam dados de pesquisa obtidos durante o desenvolvimento do projeto, analisados à luz das informações existentes na literatura. As opiniões expressas nesta publicação são de responsabilidade dos autores e não refletem, necessariamente, as das instituições as quais são filiados.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microalgas de águas continentais / editores: Diva Souza Andrade, Arnaldo Colozzi Filho. – Londrina : IAPAR, 2014.
3v. : il. ; 24 cm.

Inclui bibliografia.

Conteúdo: v.1. Potencialidades e desafios do cultivo - v.2. Produção de biomassa e coprodutos - v.3. Coleção IPR de microalgas.

ISBN 978-85-8818-449-7 (obra compl.)

1. Microalga – Cultivo. 2. Microalga – Biotecnologia. I. Andrade, Diva Souza. II. Colozzi Filho, Arnaldo.

CDU 582.26

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

2014

EDITORES

DIVA SOUZA ANDRADE

*Engenheira-agrônoma, Doutora em Ciências Biológicas
Pesquisadora, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
diva@iapar.br*

ARNALDO COLOZZI FILHO

*Engenheiro-agrônomo, Doutor em Solos e Nutrição de Plantas
Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
acollozzi@iapar.br*

AUTORES

ADRIANO RAUSCH SOUTO

*Engenheiro Sanitário, Doutor em Agronomia
Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
adriano@iapar.br*

ALEXANDRA SCHERER

*Engenheira-agrônoma, Doutora em Agronomia
Professora, Universidade Norte do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
ascherer2000@gmail.com*

ANTÔNIO COSTA

*Engenheiro-agrônomo, Doutor em Agronomia
Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
antcosta@iapar.br*

ARNALDO COLOZZI FILHO

*Engenheiro-agrônomo, Doutor em Solos e Nutrição de Plantas
Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
acolozzi@iapar.br*

CARMEN LUÍSA BARBOSA GUEDES

*Química, Doutora em Química
Professora, Universidade Estadual de Londrina
Londrina, Paraná, Brasil
carmen@uel.br*

DIVA SOUZA ANDRADE

*Engenheira-agrônoma, Doutora em Ciências Biológicas
Pesquisadora, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
diva@iapar.br*

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

*Bióloga, Mestre em Ciências de Alimentos
Companhia Paranaense de Energia
Curitiba, Paraná, Brasil
elisangela.angelo@copel.com*

FERNANDA DE ALMEIDA FIN DE LIMA

*Química, Mestre em Engenharia Química
Londrina, Paraná, Brasil
fer_fin@hotmail.com*

GABRIELA DA SILVA MACHINESKI

*Engenheira-agrônoma
Londrina, Paraná, Brasil
gabymachine@yahoo.com.br*

GRAZIELA MORAES DE CESARE BARBOSA

*Engenheira Agrícola, Doutora em Agronomia
Pesquisadora, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
graziela_barbosa@iapar.br*

HELDER RODRIGUES DA SILVA

*Biólogo, Mestre em Bioenergia
Londrina, Paraná, Brasil
heldersrodrigues@hotmail.com*

IARA CINTRA DE ARRUDA GATTI

*Química, Doutora em Agronomia
Professora, Universidade Norte do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
iaracintra@gmail.com*

JUSCELIO DONIZETE CARDOSO

*Farmacêutico Bioquímico, Doutor em Microbiologia
Professor colaborador, Universidades Federal da Paraíba
João Pessoa, Paraíba, Brasil
juscelio.cardoso@gmail.com*

MARIA APARECIDA DE MATOS

*Química, Mestre em Química dos Recursos Naturais
Analista em Ciência e Tecnologia, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
mariamatos@iapar.br*

MARIO MIYAZAWA

*Químico, Doutor em Química
Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
miyazawa@iapar.br*

MICHELE REGINA LOPES DA SILVA

*Bióloga, Doutora em Agronomia
Pesquisadora, Instituto Agronômico do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil
michele@iapar.br*

PATRÍCIA CRISTINA GOMES

Bióloga, Doutora em Zootecnia

Londrina, Paraná, Brasil

patriciacristinagomes@gmail.com

PREFÁCIO

COLEÇÃO

MICROALGAS DE ÁGUAS CONTINENTAIS

É nosso dever preservar o meio ambiente para as futuras gerações, um compromisso que afeta praticamente todas as áreas da atividade humana e, em particular, leva à busca de alternativas renováveis de energia para a promoção do desenvolvimento econômico e social.

Com essa preocupação, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a Companhia Paranaense de Energia (COPEL) e a Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio (FAPEAGRO) iniciaram o Projeto Microalgas, em 2009, com o objetivo de investigar o potencial desses microrganismos como opção energética.

A dedicada equipe avançou na coleta, classificação e identificação, cultivo em diferentes meios de cultura e chegou a definir parâmetros para avaliar a quantidade e qualidade do material graxo e dos co-produtos que possam vir a ser de interesse tecnológico e comercial.

Como resultado, além do fortalecimento da pesquisa em energias renováveis, chegou-se a uma vasta diversidade de informações úteis à comunidade científica e ao desenvolvimento da matriz energética brasileira e mundial, compiladas em três volumes (dois

técnicos e um catálogo da Coleção IPR de Microal-
gas), que são um marco para as entidades envolvidas
e para toda a sociedade paranaense.

Florindo Dalberto
Diretor-Presidente do IAPAR

PREFÁCIO

VOLUME I

POTENCIALIDADES E DESAFIOS DO CULTIVO

As microalgas são encontradas, principalmente, em ambientes aquáticos, podendo ser marinho ou continental (doce e salobra), ou subaéreos, apresentando uma grande versatilidade na adaptação a diversos ecossistemas. Desempenham vários papéis ecologicamente importantes, como produtoras primárias de energia, pelas taxas elevadas de fotossíntese, contribuindo para a fixação de dióxido de carbono (CO₂) e mitigação de gases de efeito estufa, várias espécies apresentam potencial de fixação biológica do nitrogênio e, em conjunto, essas propriedades são fundamentais para a qualidade ambiental. O potencial biotecnológico das microalgas também é impressionante, como fonte de energia, como biocompostos para a melhoria da fertilidade dos solos, para a produção de pigmentos, lipídeos e proteínas, para o uso como biocombustível, entre outros.

Com todos esses benefícios, é surpreendente que o Brasil, tão rico em águas continentais, ainda apresente um comportamento acanhado nos estudos e exploração das microalgas. Grande parte dessa defasagem científica e biotecnológica reside no baixo conhecimento sobre essas algas e este livro representa uma contribuição importantíssima para o tema, sen-

do de grande interesse para pesquisadores, estudantes, professores, órgãos governamentais, bem como para o setor privado.

No primeiro capítulo do livro, de características dos principais grupos de microalgas de águas continentais, conceitos básicos importantes são fornecidos, devendo-se destacar os conceitos moleculares, atuais e antenados com as novas metodologias utilizadas em taxonomia e filogenia de eucariotos e procariotos. Quero destacar, ainda, que visualmente este primeiro capítulo, bem como os demais que o acompanham, é bonito e didático, com quadros de memorização e informação sobre os principais conceitos.

Como curadora de uma coleção de culturas de microrganismos, tenho a declarar que o segundo capítulo, de desafios à obtenção e manutenção de estirpes unialgais em uma coleção *ex situ* está excelente e atual. As informações e o nível de detalhamento permitirão aos pesquisadores que se interessam pelo tema armazenar adequadamente as microalgas, conhecendo as particularidades desses organismos. O roteiro para o armazenamento em longo prazo é detalhado e apresenta opções considerando as condições e a infraestrutura de diversos tipos de laboratório.

No terceiro capítulo, de ambiente de crescimento de microalgas, são apresentados os principais fatores ambientais que afetam o crescimento das microalgas, incluindo uma ótima revisão de literatura sobre o tema. Muito interessante, são fornecidas informações que permitem elaborar meios de culturas variados para esses organismos e trazem informações que po-

dem ser muito úteis para o cultivo em pequena e em larga escala.

Também é relevante a complementação do terceiro capítulo com o seguinte, de sistemas potenciais de cultivo de microalgas de águas continentais. Nesse quarto capítulo, informações valiosas sobre biorreatores são disponibilizadas sendo, portanto, de grande interesse para os setores público e privado. Esses setores também terão interesse no quinto capítulo, que contém informações valiosas sobre a colheita e a conservação de biomassa de microalgas.

Finalmente, o último capítulo, de principais produtos da biomassa microalgal e suas aplicações biotecnológicas fecha com chave de ouro o volume, mostrando toda a potencialidade de uso das microalgas. Ao ler esse capítulo me senti, assim como creio que outros leitores também se sentirão, empolgada e desejosa de trabalhar com esses organismos de tão elevado potencial biotecnológico.

O cenário científico e produtivo do Brasil estava em falta com uma literatura desse porte, que certamente atrairá a atenção do público para o estudo, produção e uso das microalgas, trazendo também informações que podem embasar solicitações para investimentos visando o uso desses organismos para a produção eficiente de energia, como biofertilizantes, como biocombustíveis e para a exploração biotecnológica de uma variedade de moléculas de interesse comercial. Acho relevante também comentar que é importante que o livro seja em português, com diversos exemplos e resultados obtidos em nosso país,

desse modo aproximando o tema da nossa realidade e acelerando a obtenção de novos conhecimentos. A língua portuguesa é particularmente importante em certos capítulos, como o de manutenção das algas e de composição de meios de cultura, facilitando o entendimento das metodologias e evitando problemas de interpretação no estabelecimento das mesmas em laboratórios brasileiros. Contudo, o elevado nível científico do livro também é um convite para que, em uma próxima etapa, seja traduzido para o espanhol, o inglês e o francês, pois os temas também são de interesse de outros países americanos e africanos.

Em conclusão, este é um livro excelente e, certamente, representará um marco científico e tecnológico, uma vez que a literatura sobre o tema é escassa. Além disso, a leitura é prazerosa e, tenho certeza, agradará a públicos variados, como foi o meu caso.

Dra. Mariangela Hungria
Pesquisadora da Embrapa Soja
Membro da Academia Brasileira de Ciências
Pesquisadora 1A do CNPq
Orientadora dos Cursos de Pós-Graduação
em Microbiologia e Biotecnologia
da Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE MICROALGAS DE ÁGUAS CONTINENTAIS.....	21
Introdução	23
1.1 Grupos de Microalgas.....	24
1.2 Características Morfológicas de Microalgas.....	27
1.3 Divisão Celular e Reprodução das Microalgas.....	29
1.3.1 Reprodução assexuada	29
1.3.1.1 Reprodução assexuada por fissão binária..	29
1.3.1.2 Reprodução assexuada por esporos.....	30
1.3.1.3 Reprodução assexuada por fragmentação	31
1.3.2 Reprodução sexuada	31
1.4 Nutrição das Microalgas.....	32
1.5 Características de Crescimento.....	33
1.6 Classificação e Taxonomia	41
1.6.1 Caracterização e identificação de microalgas: abordagem molecular	43
1.6.2 Métodos moleculares para caracterização de microalgas.....	47

1.7 Características das Divisões Cyanophyta e Chlorophyta ...	54
1.7.1 Divisão Cyanophyta.....	54
1.7.2 Divisão Chlorophyta.....	56
1.8 Microalgas Geneticamente Modificadas (GM)	60
Considerações Finais	62
Referências	63

CAPÍTULO 2

FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE COLEÇÃO *EX SITU* UNIALGAL *IN VIVO*..... 73

Introdução	75
2.1 Objetivos e Normas para o Estabelecimento de uma Coleção	77
2.2 Tipos de Coleções <i>Ex Situ</i> de Microrganismos	79
2.2.1 Coleções de microalgas com material fixado	81
2.2.2 Coleções de microalgas <i>in vivo</i>	86
2.3 Formação de uma Coleção de Microalgas <i>In Vivo</i>	90
2.3.1 Coleta de material biológico.....	91
2.3.2 Isolamento e inoculação/repicagem de células unialgais.....	93

2.3.3 Codificação das estirpes numa Coleção <i>ex situ</i>	100
2.3.4 Caracterização das estirpes e identificação das espécies.....	103
2.3.5 Manutenção das estirpes de microalgas em cultivo.....	103
2.4 Obtenção de Cultivos Unialgais.....	104
2.4.1 Lavagem de células e centrifugação	106
2.4.2. Diluição serial do cultivo	107
2.4.3 Ultrassom/Sonicador	107
2.4.4 Radiação ultravioleta	108
2.4.5 Filtração ou difusão em meio de cultura sólido	108
2.4.6 Antibióticos.....	109
2.5 Manutenção das Culturas Unialgais em Subcultivo	111
2.6 Preservação das Culturas Unialgais Viáveis.....	112
2.6.1 Congelamento.....	122
2.6.2 Liofilização	123
2.6.3 Criopreservação.....	125
2.6.4 Vitrificação/Encapsulamento.....	129
2.7 Recuperação de Microalgas Preservadas.....	132
Considerações finais	134
Referências	135

CAPÍTULO 3

AMBIENTE DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS 143

Introdução 145

3.1 Fatores que Influenciam no Cultivo de Microalgas..... 145

3.1.1 Temperatura 145

3.1.2 Luminosidade..... 147

3.1.3 Aeração 149

3.1.4 pH 151

3.2 Nutrientes 152

3.3 Gás Carbônico 158

3.4 Meios Alternativos de Cultivo 160

Considerações Finais 167

Referências 169

CAPÍTULO 4

SISTEMAS POTENCIAIS DE CULTIVO DE MICROALGAS..... 175

Introdução 177

4.1 Microalgas e Fontes de Carbono 178

4.2 Características dos Processos Metabólicos	179
4.2.1 Sistema fotoautotrófico.....	179
4.2.2 Sistema heterotrófico	181
4.2.3 Sistemas mixotrófico e fotoheterotrófico.....	186
4.3 Cultivos Monoalgáceos e Mistos	190
4.4 Condições Hidráulicas de Cultivo.....	190
4.5 Microalgas em Fotobiorreatores.....	193
4.5.1 Fotobiorreatores abertos	193
4.5.2 Fotobiorreatores fechados.....	198
4.6 Limpeza e Esterilização dos Sistemas	200
4.7 Viabilidade Econômica da Produção.....	201
Considerações Finais.....	204
Referências	205

CAPÍTULO 5

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

213

Introdução 215

**5.1 Pré-etapas da Concentração/Recuperação
das Células de Microalgas.....** 216

5.1.1 Coagulação/floculação de células de microalgas.....	219
5.1.2 Tipos de coagulantes/floculantes	220
5.1.3 Floculação química para concentração de células.....	227
5.1.4 Coagulação/floculação com agentes físicos.....	232
5.1.4.1 Separação magnética/ultrassom.....	232
5.1.4.2 Eletrocoagulação/eletrofloculação	233
5.1.5 Biofloculação	236
5.2 Colheita por Filtração.....	242
5.2.1 Microfiltração e ultrafiltração	246
5.3 Colheita por Centrifugação	248
5.4 Desidratação e Conservação da Biomassa de Microalgas	250
5.4.1 Secadores solares para extração da água da biomassa de microalgas.....	250
5.4.2 Congelamento da biomassa de microalgas	251
5.4.3 Secagem da biomassa de microalgas por atomização.....	251
5.4.4 Secagem da biomassa de microalgas por liofilização	252
Considerações Finais.....	254
Referências	255

CAPÍTULO 6

PRINCIPAIS PRODUTOS DA BIOMASSA ALGAL E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS..... 265

Introdução 267

6.1 Pigmentos e suas Aplicações 270

6.1.1 Ficobilinas..... 273

6.1.2 Clorofilas nas microalgas 274

6.1.3 Carotenoide total..... 279

6.1.3.1 β -caroteno 283

6.1.3.2 Astaxantina 284

6.1.3.3 Luteína 286

6.2 Carboidratos, Proteínas e Polissacarídeos da Biomassa de Microalgas 287

6.3 Lipídeos da Biomassa de Microalgas 292

6.3.1 Lipídeos e sua classificação..... 292

6.3.2 Produtividade e composição de lipídeos na biomassa de microalgas..... 295

6.3.3 Extração de lipídeos da biomassa de microalgas..... 306

6.4 Microalgas como Fonte de Energia Renovável Alternativa 308

6.4.1 Produção de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄) a partir da biomassa de microalgas 310

6.4.2	Produção de bioetanol por fermentação da biomassa de microalgas.....	312
6.4.3	Lipídeos de microalgas como potencial fonte de biodiesel.....	313
6.5	Aplicações Biotecnológicas das Microalgas na Agropecuária e na Biorremediação	316
6.5.1	Fixação biológica de CO ₂ e biorremediação	317
6.5.2	Biomassa de microalgas na nutrição animal.....	321
6.5.3	Fixação biológica de N ₂ e biofertilizantes.....	322
	Considerações Finais.....	326
	Referências	327

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE MICROALGAS DE ÁGUAS CONTINENTAIS

*Diva Souza Andrade
Michele Regina Lopes da Silva
Alexandra Scherer
Juscélio Donizete Cardoso*

Introdução

As algas representam um grupo de organismos de grande diversidade morfofisiológica e genética, englobando indivíduos microscópicos e macroscópicos. Existem semelhanças entre as algas macroscópicas e as plantas superiores, entretanto, algumas características são bem distintas entre esses dois grupos como, por exemplo, a ausência de tecidos vasculares nas algas.

A origem da ficologia aplicada data do estabelecimento da cultura de *Chlorella* sp. por Beijerinck, em 1890 (RICHMOND, 2004b). Na Ficologia, o termo alga se refere a todo organismo que possui um talo não diferenciado em raiz, caule, folhas e moléculas de clorofila *a* em sua constituição, que possibilitam a realização de fotossíntese oxigênica (LEE, 2008; MUTANDA et al., 2011). Este é um grupo polifilético, não coesivo e artificial de organismos que evoluíram de diferentes origens. Segundo Bicudo e Menezes (2006), o termo alga foi proposto por Lineu como uma categoria taxonômica, em 1753, no clássico trabalho *Species plantarum*. O número de espécies de algas foi estimado em cerca de dez milhões, sendo a maioria de microalgas, de acordo com a revisão de Barsanti e Gualtieri (2008). Nesta publicação, serão abordadas as microalgas, ou seja, algas microscópicas unicelulares, procariontes e eucariontes.

Ecologicamente, as microalgas fazem parte dos chamados produtores primários de energia, além de serem responsáveis por pelo menos 60% desse tipo de energia, ainda pelo processo da fotossíntese são eficientes fixadores de dióxido de carbono (RAVEN et al., 2001; HAUBNER et al., 2006; CHISTI, 2007b).

As algas são encontradas em ambientes aquáticos marinhos ou continentais (doce e salobra) ou subaéreos, tolerando ampla faixa de temperatura, radiação, turbidez, concentração de oxigênio e dióxido de carbono. Um número considerável de algas de ambientes subaéreos tem se adaptado à vida terrestre, ocorrendo em troncos de árvores, pelos de animais, rochas e desertos. Embora sejam organismos livres, existem microalgas

que vivem em associação simbiótica com outros organismos e podem apresentar interesse agrônomico, como as cianobactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (*Anabaena* sp.) em associação com *Azolla* sp., uma pteridófita aquática, por exemplo (GUOCE et al., 2011; GUPTA et al., 2013). Deve-se, também, destacar o papel das algas na fertilidade do solo (SHIELDS, 1982) como promotoras do crescimento de plantas (GUPTA et al., 2013), bem como biotransformadoras de compostos no solo (LOPEZ et al., 2013). Cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Nostoc*, que formam heterocistos, exibem não apenas a capacidade de fixar N_2 , mas também são promotoras de crescimento de diversas plantas herbáceas e vegetais com produção de ácido indol acético (HASHTROUDI et al., 2012).

A maioria das espécies de microalgas de interesse para produção de pigmentos, proteínas, lipídeos e bioenergia (biodiesel e biogás) está distribuída nos reinos Eubacteria e Eucarya, especialmente dentro dos grupos cianófitas e clorófitas (LEE, 2011).

As diversas classes de microalgas são diferenciadas pelas características morfológicas, composição bioquímica (especialmente os pigmentos), cloroplastos, ultraestrutura celular, ciclo de vida e dados de sequências do genoma (ANDERSEN, 2004).

Na primeira parte deste capítulo são relatadas as principais características celulares de reprodução e de nutrição comuns a esses dois grupos de microalgas. Em seguida, dentro de cada grupo serão apresentadas suas respectivas peculiaridades e também uma abordagem dos métodos moleculares para auxiliar na caracterização genética e identificação das espécies dos grupos cianófitas e clorófitas.

1.1 Grupos de Microalgas

Conforme mencionado anteriormente, o termo microalgas inclui organismos de dois grupos: procariontes e euca-

riontes. As microalgas procariontes são também chamadas de algas azuis, cloroxibactérias, cianobactérias ou cianófitas. As microalgas eucariontes são chamadas de algas verdes ou clorófitas e diferenciam-se das cianobactérias por apresentarem núcleo e organelas envolvidos por membranas, cromossomos complexos e células individuais geralmente maiores que as das cianófitas. As microalgas clorófitas representam um conjunto extremamente diversificado de organismos que não formam um grupo coerente filogeneticamente, uma vez que não descendem de um único ancestral (TORTORA et al., 2000; BARSANTI et al., 2008).

Os maiores desafios da exploração da diversidade natural de microalgas de águas continentais referem-se à identificação, classificação e aos estudos taxonômicos. Assim como os demais grupos de organismos, sua classificação foi sendo modificada de acordo com o surgimento de novas teorias (Tabela 1.1).

A classificação vigente das microalgas baseou-se em estudos moleculares comparativos da região 16S do RNAr de diversos organismos (WOESE et al., 1990). Nesta publicação, é proposta uma árvore filogenética universal, na qual três ramos são evidenciados, sendo dois compostos por organismos procariontes e um por organismos eucariontes. Esses ramos foram denominados de domínios: Archaea, Bacteria e Eucarya. Com base em uma série de estudos, as algas procariontes (algas azuis ou cianófitas) foram agrupadas no domínio Bacteria, enquanto as algas eucariontes (clorófitas) foram dispersas em diferentes linhagens do domínio Eucarya (WOESE et al., 1983; WOESE, 1987; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). Informações mais detalhadas sobre os estudos taxonômicos das algas de águas doces continentais no Brasil são apresentadas por Bicudo e Menezes (2006) e por Martins et al. (2012).

Tabela 1.1. Classificação das microalgas ao longo das teorias de classificação dos seres vivos.

Teoria	Reino/Domínio
Lineu (1758)	<p>PLANTAE Microalgas (cianófitas e clorófitas)</p> <p>ANIMALIA</p>
Haeckel (1894)	<p>PROTISTA Microalgas (cianófitas)</p> <p>PLANTAE Microalgas (clorófitas)</p> <p>ANIMALIA</p>
Whitaker (1977)	<p>MONERA Microalgas (cianófitas)</p> <p>PROTISTA Microalgas (clorófitas)</p> <p>FUNGI</p> <p>PLANTAE</p> <p>ANIMALIA</p>
Woese et al. (1977)	<p>EUBACTERIA Microalgas (cianófitas)</p> <p>ARCHAEABACTERIA</p> <p>PROTISTA Microalgas (clorófitas)</p> <p>FUNGI</p> <p>PLANTAE</p> <p>ANIMALIA</p>
Woese, Kandler e Wheelis (1990)	<p>BACTERIA Microalgas (cianófitas)</p> <p>ARCHAE</p> <p>EUCARYA Microalgas (clorófitas)</p>

Fonte: Adaptado de Pelzcar et al. (1997).

1.2 Características Morfológicas de Microalgas

A estrutura principal das microalgas é chamada de talo e sua morfologia é variada, podendo ser unicelular, colonial, cenobial, filamentosos e sifonoso. O diâmetro do talo unicelular pode variar de 0,2 μm a 2,0 μm , dependendo da espécie (BARSANTI et al., 2006b). Microalgas que apresentam talo na forma colonial podem ser definidas como um aglomerado altamente organizado de células individuais que são frouxamente unidas. Nesse caso, não existe divisão de trabalho entre as células ou número pré-determinado de indivíduos. A divisão celular ocorre por fissão binária e cada célula pode sobreviver individualmente.

Nas microalgas com talo na forma de cenóbio, o número de células é determinado na sua origem e permanece constante durante todo o ciclo de vida. O talo filamentosos é formado por cadeias de células irmãs, que se dividem perpendicularmente ao eixo, conectadas pela parede celular. Este filamento pode ser simples ou septado, com um ou vários núcleos, e constituído de uma ou várias camadas de células. O talo sifonoso ou cenocítico é unicelular, multinucleado e consiste num filamento tubular que não apresenta parede celular transversal (TOMASELLI, 2004; BARSANTI et al., 2006; BARSANTI; GUALTIERI, 2008).

Os talos das microalgas apresentam células diferenciadas chamadas de acinetos e heterócitos. Os acinetos são células vegetativas que acumulam grande quantidade de substâncias de reserva, sofrem espessamento de parede celular para se transformarem em esporos de resistência, capazes de resistir a condições adversas. Os acinetos estão presentes em clorófitas e em cianófitas, sendo que nestas também estão relacionados à reprodução. Os heterócitos são células diferenciadas a partir de células vegetativas de cianobactérias filamentosas. Estas também apresentam espessamento de parede celular e poros que possibilitam a comunicação com as células adjacentes. Essas células diferenciadas acumulam clorofila *a* e auxiliam na fixa-

ção do nitrogênio atmosférico (LOURENÇO, 2006; FRANCESCHINI et al., 2010).

Em relação à mobilidade (motilidade), o talo das microalgas é considerado móvel quando apresenta flagelos. Contudo, as células individuais podem apresentar formas alternativas de deslocamento celular quando estão em contato com uma superfície sólida, e essa forma de motilidade das microalgas é conhecida por *gliding* (RICHMOND, 2004b; TOMASELLI, 2004; BARSANTI et al., 2006). Esse tipo de movimento está presente em cianobactérias, microalgas vermelhas, diatomáceas e algumas clorófitas. Entre as cianobactérias, as formas filamentosas, por exemplo, dos gêneros *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Phormidium* e *Anabaena* são as que se movem por *gliding* de maneira mais eficiente. Nessas espécies, o movimento pode ocorrer por contrações, rolamento lateral da célula ou sobre seu eixo longitudinal. A movimentação é facilitada pela secreção de muco ou mucilagem, que é excretada através da parede da célula por poros em forma de balão. Ao se movimentar, as células deixam um rastro de mucilagem que incha ao entrar em contato com a água e empurra as células para frente (TOMASELLI, 2004). A presença de fibrilas como a oscilina – uma glicoproteína presente na superfície externa da célula, cuja disposição possibilita a capacidade de girar – também facilita esse tipo de movimentação (BARSANTI; EVANGELISTA; FRASSANITO et al., 2008). Espécies de microalgas como a *Anabaena flos-aquae* têm a capacidade de controle de flutuação devido à presença de pneumatócitos e vacúolos no talo, o que também é considerado uma forma de movimentação.

Na natureza, a presença de predadores potenciais pode induzir variações na morfologia ou no estado fisiológico das algas. Esse fenômeno é chamado de plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD, 1989) e ocorre em resposta a certas condições ambientais. Na célula das clorófitas, as características que mais podem variar morfologicamente são: tamanho, forma e estrutura da parede da celular. A formação de colônias e

espinhos é um bom exemplo de variação morfológica utilizada para escapar da ação herbívora de predadores. O fenômeno da plasticidade é dependente de sinal no ambiente natural, não ocorrendo em condições de cultivo em laboratório, o que pode levar a interpretações taxonômicas errôneas.

1.3 Divisão Celular e Reprodução das Microalgas

A reprodução em algas é bastante diversificada e pode ocorrer de forma vegetativa, assexuada e sexuada. Acontece primariamente pela divisão de células vegetativas (assexuadas), embora a reprodução sexuada possa ocorrer em muitas espécies quando estão em condições apropriadas para a replicação celular. Neste livro, a descrição das formas de reprodução das microalgas é apresentada de forma resumida e as ilustrações dos ciclos reprodutivos podem ser encontradas em Tomaselli (2004), Andersen (2005) e Barsanti e Gualtieri (2006).

1.3.1 Reprodução assexuada

1.3.1.1 Reprodução assexuada por fissão binária

A fissão binária é a forma mais simples de reprodução e ocorre na maioria das microalgas unicelulares. A célula duplica seu material genético e dá origem a duas células vegetativas idênticas. Estas duas células-filhas dão origem a quatro células e assim por diante. Em algas unicelulares esta divisão celular pode ocorrer no sentido longitudinal e no transversal. Em microalgas coloniais, o processo se realiza da mesma maneira, entretanto repetindo o processo em cada célula individualmente. Esse tipo de reprodução é característico em espécies dos gêneros *Volvox* e *Pediastrum* das clorófitas.

Em muitas espécies, a reprodução assexuada está relacionada ao aumento no tamanho da célula ou da colônia. As microalgas com talos coloniais se reproduzem por um processo denominado autocolônia, no qual cada célula da colônia é capaz de formar outra colônia semelhante a original.

1.3.1.2 Reprodução assexuada por esporos

Os esporos podem ser produzidos a partir de células vegetativas, de células especializadas ou, ainda, formando estruturas denominadas esporângios. Também existe outras formas de esporos, denominados acinetos, que são produzidos por muitas espécies de microalgas quando estão em condições desfavoráveis como, por exemplo, a falta de água. Esses acinetos são esporos originados da diferenciação de uma célula vegetativa, repletos de substâncias de reserva e com parede espessada, podendo permanecer assim durante anos, até que ocorra novamente uma situação favorável de desenvolvimento para reestabelecer sua forma vegetativa (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Esse processo ocorre, por exemplo, em diversos gêneros da classe das Chlorophyceae, tais como *Ulotrix* spp., *Chlorococcum* spp. e *Spyrogyra* spp.

A reprodução assexuada também pode ser realizada por meio de diferentes tipos de esporos chamados zoósporos, aplanósporos e autósporos. Os zoósporos são esporos flagelados que se movimentam e podem se reproduzir com as partes vegetativas de outras células, como acontece em espécies do gênero *Clamydomonas* da família Chlamydomonadaceae. Aplanósporos são esporos não flagelados que iniciam seu desenvolvimento a partir de uma porção da célula e se diferenciam até formar os zoósporos. Os autósporos são esporos não flagelados, a segunda geração de células que podem ter sido formadas a partir da célula original. Essas células são praticamente réplicas das células vegetativas e possuem a capacidade de produzir zoósporos. Esse tipo de esporo está presente nas espécies dos gêneros *Nanochloropsis* (Heterokontophyta) e *Chlorella* (Chlorophyta).

1.3.1.3 Reprodução assexuada por fragmentação

Essa forma de reprodução ocorre em espécies filamentosas e nas que formam colônias cenobiais. Nesse processo, o talo se quebra e, por mitose, cada fragmento multiplica suas células, originando novos talos idênticos, que dão origem a novos indivíduos. Nesse tipo de reprodução também pode ocorrer a junção de muitos fragmentos e a formação de novos indivíduos.

1.3.2 Reprodução sexuada

A reprodução sexuada também está presente em muitas espécies de microalgas e permite a troca genética, mantendo a variabilidade genética dentro da população (TOMASELLI, 2004; BLACKBURN et al., 2005). A reprodução sexuada em microalgas envolve um número de diferentes estágios que formam o ciclo de vida sexuado, incluindo a produção e a fusão de gametas. Isso pode aumentar a sobrevivência e, portanto, o sucesso evolucionário (BLACKBURN; PARKER, 2005). Os gametas podem ser morfológicamente idênticos às células vegetativas ou diferentes do material de origem, dependendo do grupo ao qual pertence a microalga. Também é possível a combinação de diferentes tipos de gametas.

Na reprodução sexuada das microalgas (Tabela 1.2) podem ocorrer os três ciclos básicos de vida haplobionte: haplonte (vegetativa), diplonte (gamética) e diplohaplonte (esporofítica).

O ciclo haplobionte haplonte ou vegetativo apresenta apenas uma fase vegetativa haploide (n) com a meiose pós-zigótica do zigoto diploide ($2n$). O ciclo haplobionte diplobionte ou ciclo de vida gamético apresenta uma fase diploide ($2n$) e uma fase haploide (n), esta por meio de meiose pré-gamética, que origina gametas haploides (n). No ciclo diplohaplonte ou ciclo de vida esporofítico ocorrem duas fases diferentes: uma

Tabela 1.2. Características dos ciclos de vida da reprodução sexuada em algas.

Características	Ciclo de vida haplobionte		
	Haplonte (vegetativa)	Diplonte (gamética)	Diplohaplonte (esporofítica)
Número de fases	1 fase: n	1 fase: 2n	2 fases: n e 2n
Formação de gametas	Mitose e meiose pós-zigótica	Meiose pré-gamética	Mitose e meiose pré-espórica
Gameta	Gameta 2n	Gameta n	Esporo 2n e gameta n

com gametas haploides (n) e outra com esporos diploides (2n), caracterizando a alternância de gerações. Na fase gametofítica, a mitose produz gametas (n), enquanto na fase esporofítica a meiose pré-espórica produz esporos (2n).

1.4 Nutrição das Microalgas

Em relação à nutrição, as microalgas podem ser fotoautotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. As microalgas fotoautotróficas são dependentes da fotossíntese e utilizam como fontes de energia a luz solar e o dióxido de carbono para produzir trifosfato de adenosina (ATP) e carboidratos.

As células que consomem compostos orgânicos produzidos por fontes externas para satisfazer as necessidades energéticas são denominadas heterotróficas (do grego *heteros*, outros e *trophos*, que come). Portanto, a microalga heterotrófica obrigatória depende de uma fonte externa de moléculas orgânicas para obter sua energia.

Nas microalgas cianófitas e clorófitas, a nutrição ocorre por heterotrofia facultativa e fototrofia obrigatória ou heterotrófica. A maioria das microalgas clorófitas é fotoautotrófica, todavia, algumas espécies podem ser incolores e heterotróficas, obtendo o carbono do ambiente externo a partir de substâncias dissolvidas ou secretadas de outras células como, por exemplo, de bactérias. Microalgas auxotróficas são aquelas que não conseguem sintetizar seus componentes essenciais, como ácidos graxos e vitaminas do complexo B12.

Entretanto, muitas microalgas podem apresentar comportamento de fotoautotrofia e heterotrofia, sendo chamadas de algas mixotróficas. A presença de microalgas fotoautotróficas e heterotróficas em um mesmo habitat pode ser uma vantagem, pois as autotróficas conseguem fornecer elementos essenciais às heterotróficas. Organismos heterotróficos conseguem se adaptar em locais onde o fator luz é limitado. Algumas espécies mixotróficas obtêm energia da fotossíntese e raramente a partir de fontes de carbono disponíveis no meio.

A fixação de carbono pela fotossíntese ou por meio da absorção de partículas pode disponibilizar outros nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro e, dessa forma, contribuir para a produção de vitaminas e aminoácidos essenciais.

1.5 Características de Crescimento

O crescimento das microalgas depende de fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos incluem taxas metabólicas da espécie cultivada, influência de organismos contaminantes e fatores físico-químicos como luz, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (TOMASELLI, 2004).

As microalgas, exceto as cianobactérias e as proclorófitas, têm organelas celulares, incluindo os plastos. A estrutura interna dos cloroplastos apresenta um sistema de membranas na forma de vesículas achatadas, nominadas de tilacoides,

que estão conectadas entre si e embebidas em um estroma rico em proteínas. Os pigmentos de clorofila e os carotenoides são encontrados embebidos nas membranas dos tilacoides. Os cloroplastos das algas verdes frequentemente contêm grãos de amido e pequenas gotículas de lipídeo. Os grãos de amido são produtos de armazenamento temporário e se acumulam somente quando a alga está ativamente fotossintetizando (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A atividade fotossintética das algas, que responde por mais de 50% da fotossíntese global, torna possível converter a energia da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em energia biologicamente utilizável, por meio de reações de redução e oxidação. No cultivo de microalgas, o ideal é a taxa máxima de crescimento equivalente à taxa máxima da fotossíntese. Maiores detalhes sobre a fotossíntese oxigênica das microalgas podem ser encontrados em Masojiidek et al. (2004). A irradiância sobre a superfície da Terra é, em média, de 1000 Wm^{-2} ($1 \text{ Wm}^{-2} = 4,5 \mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), da qual aproximadamente 8% corresponde à luz UV (300-400 nm), 41% à luz visível (400-700 nm) e 51% à luz infravermelha (700-4000 nm). Ao passar pela atmosfera e pela coluna d'água, a luz sofre fenômenos de absorção, reflexão e dispersão pela presença de moléculas de vapor d'água, poeira, poluição, etc. Contudo, apenas a faixa de luz visível corresponde à radiação fotossinteticamente ativa (PAR), aquela capaz de excitar os elétrons das moléculas e assim possibilitar a realização de fotossíntese, que é o processo de fornecimento de energia básica para as algas.

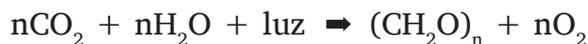
Para a realização da fotossíntese, a PAR é captada por vesículas achatadas chamadas tilacoides, nas quais estão presentes os pigmentos fotossintéticos, tanto nas cianófitas quanto nas clorófitas. Nas cianófitas, os tilacoides ocorrem livremente no citoplasma das células e dentro deles estão presentes pigmentos chamados de ficobiliproteínas. Em microalgas clorófitas, os tilacoides podem estar livres ou arranjados dentro de organelas chamadas plastos, presentes no citoplasma. Os plastos contêm uma grande variedade de pigmentos fotossintéticos que lhes

atribui coloração verde, alaranjada ou parda, de acordo com o pigmento predominante: clorofilas, ficobiliproteínas e carotenoides. Esses pigmentos apresentam potencial de aproveitamento na indústria farmacêutica e de alimentos.

As células das microalgas possuem paredes formadas por camadas internas e externas de composição variada. A camada externa é composta de polissacarídeos, tais como pectina, ágar e alginato. As microalgas são consideradas fonte promissora de matéria-prima para a produção de bioetanol, pois possuem celulose na parede celular e acumulam amido, que podem transformar em açúcares e fermentar para subsequente produção de bioetanol via fermentação microbiana. Exemplos desses pigmentos e os produtos de reserva são apresentados na Tabela 1.3.

As clorofilas são divididas em *a*, *b*, *c* e *d*, de acordo com o pico de absorção da radiação luminosa. A clorofila *a* está presente em todos os organismos fotossintetizantes, sendo as demais consideradas pigmentos acessórios, com a função de aumentar a luminosidade absorvida. As ficobiliproteínas são pigmentos azuis (ficocianinas) ou vermelhos (ficoeritrinas), compostas por uma ficobilina associada a uma proteína, que funcionam como pigmento fotossintetizante. Os carotenoides são pigmentos amarelos, marrons, laranjas e vermelhos, divididos em dois grupos: carotenos (β -caroteno e luteína) e xantofilas (aloxantina, astaxantina, fucoxantina, etc.).

As microalgas realizam fotossíntese oxigênica, que consiste em uma reação de redução na qual a energia luminosa é transformada em energia química em decorrência da conversão do dióxido de carbono (CO_2) e da água (H_2O) em carboidratos $[(\text{CH}_2\text{O})_n]$ e oxigênio (O_2), de acordo com a equação (BARSANTI; GUALTIERI, 2006):



Essa reação fotossintética é dividida em fase escura e fase luminosa. Na fase luminosa, ocorre a absorção de luz, trans-

ferência de elétrons e translocação de prótons, resultando na produção de NADPH_2 , ATP e O_2 . Na fase escura, o CO_2 é reduzido a $(\text{CH}_2\text{O})_n$ usando o NADPH_2 e o ATP produzidos na fase clara. A fase escura ocorre independente da presença de luz e simultaneamente à fase clara. A atividade fotossintética é calculada pela relação da quantidade de oxigênio e da intensidade luminosa. Nesta, quanto maior a luminosidade, menor a eficiência fotossintética da célula. O declínio da taxa fotossintética ocorre por um fenômeno denominado fotoinibição da fotossíntese e acontece quando a célula fica exposta a uma luminosidade maior que sua necessidade durante muito tempo.

Tabela 1.3. Composição da parede celular, produtos de reserva e exemplos de pigmentos presentes em microalgas.

Características	Divisão	
	Cyanophyta	Chlorophyta
Composição da parede	Peptídeo-glicano, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas e lipopolissacarídeos	Celulose e hemicelulose
Produtos de reserva	Cianoficina (arginina e polímero asparagina) e amido cianoficiano (α -1,4-glucano)	Amido e lipídeo (α -1,4-glucano)
Clorofila	<i>a</i>	<i>a</i> e <i>b</i>
Ficobilina	c-ficoeritrina, c-ficocianina, aloficocianina e ficoeritrocianina	Ausente
Carotenoide total	β -caroteno	α -, β - e γ -caroteno
Xantofila	Mixoxantina e zeaxantina	Luteína e parsinoxantina

Fonte: Barsanti e Gualtieri (2006); Chen et al. (2013).

Os grupos de microalgas abordados neste capítulo – as cianobactérias e as clorófitas – estão destacados na Figura 1.1, que apresenta a árvore filogenética dos grupos de organismos com capacidade de produzir pigmentos (SCHLARLAB-RIDLEY, 2011). A variedade de tipos de pigmentos presentes nas algas, em geral, é muito grande e essa abundância pode ser aproveitada em diferentes ramos da pesquisa e comercialização.

Rotineiramente, em laboratórios de microbiologia, o cultivo de microalgas é realizado em sistema fechado ou estanque denominado de “batelada”, devido ao baixo custo do equipamento, ao material empregado (vidrarias) e à simplicidade do procedimento, não sendo possível a entrada ou saída de qualquer material, ou seja, os recursos são finitos. Nesse sistema, a população de microalgas aumenta a densidade de células constantemente, até à exaustão do fator limitante, enquanto outros nutrientes do meio de cultura decrescem com o tempo

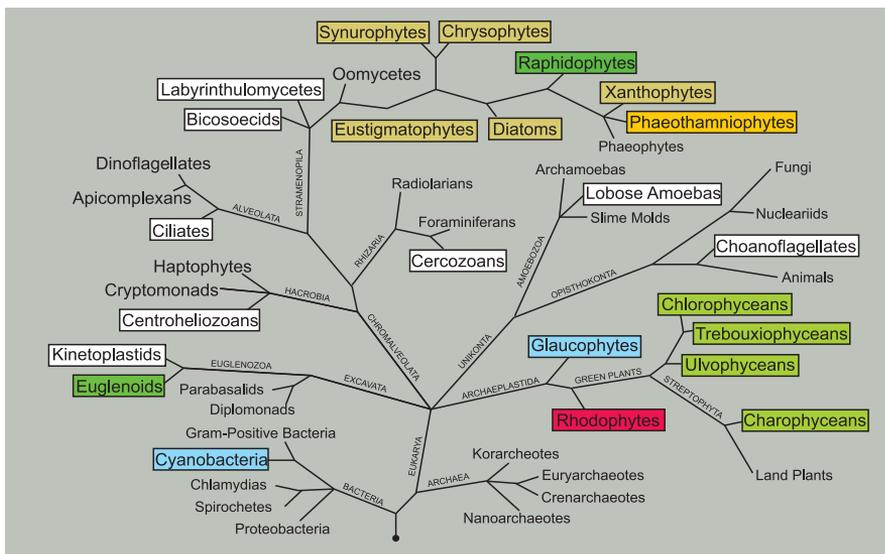


Figura 1.1. Árvore filogenética mostrando a diversidade dos domínios com produção de pigmentos.

(BARSANTI; GUALTIERI, 2006). O desenvolvimento das microalgas em cultivos estanques ou em “bateladas”, semelhante ao que ocorre com bactérias, é expresso por uma curva exponencial de crescimento, definido como um aumento na substância viva, normalmente no número de células para os microrganismos unicelulares ou na massa total de células para os multicelulares (TOMASELLI, 2004). O crescimento das microalgas pode variar com os nutrientes do meio de cultivo, as condições de temperatura e luminosidade, e apresenta fases distintas (Tabela 1.4). A taxa de crescimento é o parâmetro mais utilizado para medir alteração no número ou massa celular por unidade de tempo.

Essa curva exponencial de crescimento microbiano é dividida em fases:

- i) Lag, onde ocorre a adaptação ou a indução de crescimento;
- ii) Log ou de crescimento exponencial;
- iii) Fase de redução de crescimento ou transição;
- iv) Estacionária de crescimento;
- v) Fase de declínio ou morte celular devido à limitação de substrato ou produção e acúmulo de metabólitos tóxicos.

A duração de cada fase de crescimento é muito variável entre as espécies de microalgas. As principais atividades presentes em cada fase da curva de crescimento das microalgas em cultivos estanques estão descritas na Tabela 1.4.

No cultivo contínuo de microalgas, as quantidades de nutrientes podem ser reguladas pela adição de meios de cultura para manter o crescimento.

Na Figura 1.2 é apresentado um exemplo da curva de crescimento de uma estirpe da espécie *Neochloris oleoabundans*, pertencente à classe Chlorophyceae e à família Palmellaceae, de acordo com a classificação de Bicudo e Menezes (2006). Em sistema fechado, a curva de desenvolvimento das espécies de cianófitas também segue uma curva de crescimento logarítmica.

Tabela 1.4. Principais características de cada fase da curva de crescimento exponencial em cultivos de microrganismos (microalgas) em sistemas de “batedada” (estanque).

Fases de crescimento	Características
Lag ou de adaptação	<ul style="list-style-type: none"> - Intensa atividade metabólica, principalmente a síntese de DNA e enzimas; - Aumento na biomassa, com pequenas variações na densidade e no volume celular.
Log ou de crescimento exponencial	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da taxa de crescimento atinge valor constante; - Maior atividade metabólica; - Excreção de compostos orgânicos no meio de cultivo; - Duração variável, de acordo com a disponibilidade de nutrientes essenciais.
Redução de crescimento ou transição	<ul style="list-style-type: none"> - Redução relativa na taxa de crescimento; - Grande volume de biomassa; - Estado fisiológico da população menos favorável ao crescimento; - Pode ser difícil de ser detectada devido à semelhança com suas fases adjacentes.
Estacionária ou equilíbria	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição da velocidade de crescimento: a taxa de crescimento se torna estável e mais baixa; - O número de morte celular é equivalente ao de células novas; - Grande volume de biomassa e excreção de metabólitos; - Geralmente é a fase mais longa de crescimento microbiano.
Declínio ou morte celular	<ul style="list-style-type: none"> - Morte das células; - Taxa negativa de crescimento, isto é, o número de células mortas excede o de células novas; - Presença de autoinibidores de crescimento; - Duração variável e altamente dependente da espécie/estirpe.

Fonte: Tortora e Funke et al. (2000); Richmond (2004b); Barsanti e Gualtieri (2006); Bícudo e Menezes (2006); Lourenço (2006); Lee (2008); Franceschini e Burliga et al. (2010); Riviers (2010).

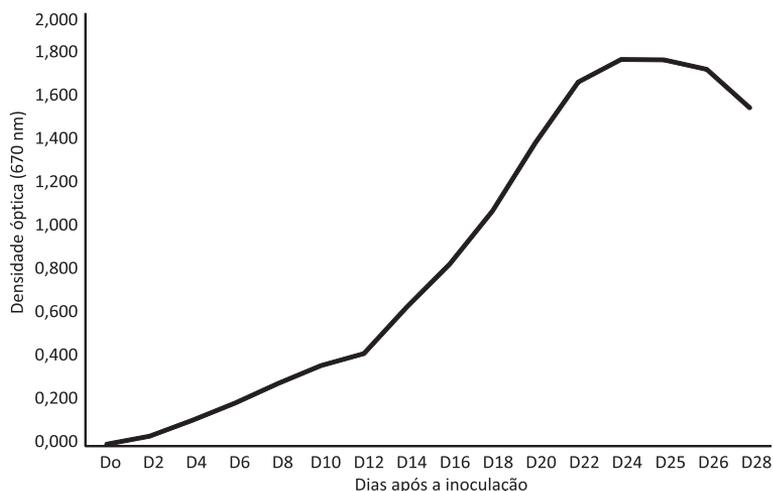


Figura 1.2. Desenvolvimento da microalga clorófita *Neochloris oleoabundans* em sistema fechado a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, durante 28 dias, com agitação.

Tabela 1.5. Principais características morfofisiológicas de microalgas das Divisões Cyanophyta e Chlorophyta.

Domínio/ Divisão	Talo	Parede celular	Motilidade	Reprodução	Nutrição
Bactéria/ Cyanophyta	Unicelular, colonial e filamentoso. Formação de acineto e heterocisto.	Mureína	Sem flagelo "gliding"	Assexuada e parassexuada	Autotrófica e heterotrófica
Eucarya/ Chlorophyta	Unicelular, colonial, filamentoso, sifonoso, parenquimatoso pseudofilamentoso, pseudoparenquimatoso e formação de acineto	Celulose e outros polímeros	Com ou sem flagelo "gliding"	Sexuada e assexuada	Autotrófica, heterotrófica e mixotrófica

As características morfológicas e fisiológicas são de fundamental importância na taxonomia e classificação tradicional das microalgas, assim, as principais características morfofisiológicas dos grupos cianófito e clorófito estão sumarizadas na Tabela 1.5. Essas informações foram sumarizadas com base em Raven et al. (1996), Richmond (2004), Barsanti e Gualtieri (2006), Lourenço (2006), Lee (2008), Franceschini et al. (2010) e Riviers (2010).

1.6 Classificação e Taxonomia

Na classificação das microalgas são considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (HU et al., 2004; TOMASELLI, 2004). Também utilizam-se das características dos diferentes tipos de pigmentos presentes nas células e da natureza química dos produtos de reserva e dos constituintes da parede celular das microalgas. A classificação geral das microalgas, com alguns exemplos de gêneros, é apresentada na Tabela 1.6.

Tradicionalmente, as microalgas foram classificadas de acordo com as regras de nomenclatura botânica. Assim, os agrupamentos primários são designados como divisões, agrupamentos secundários como classes e assim por diante. Esse sistema é impraticável, tanto para as cianobactérias (procariontes) quanto para os protistas (incluindo algas), pois os organismos associados a essas categorias tradicionais não formam grupos filogenéticos bem definidos. Divisões mais tradicionais de algas eucariontes são mais estreitamente relacionadas aos principais grupos de protistas não-algais do que qualquer outra divisão de algas. A classificação proposta por Hoek (1995) inclui 11 divisões e 30 classes, sendo que as microalgas procariontes possuem representantes nas divisões e classes Cyanophyta/Cyanophyceae e Prochlorophyta/Prochlorophyceae, enquanto os eucariontes possuem representantes nas

Tabela 1.6. Principais grupos de microalgas dos domínios Bacteria e Eucarya.

Domínio	Divisão	Classe
Bacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eucarya	Chlorophyta	Prasinophyceae, Chlorophyceae, Ulvophyceae, Cladophorophyceae, Bryopsidophyceae, Dasycladophyceae, Klebsormidiophyceae, Trentepohliophyceae, Pleurostrophyceae, Zygnematophyceae e Charophyceae.
	Heterokontophyta	Chrysophyceae, Parmophyceae, Sarcinochrysidophyceae, Xanthophyceae, Eustigmatophyceae, Bacillariophyceae, Bacillariophyceae, Dictyochophyceae e Phaeophyceae.
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae e Florideophyceae.
	Haptophyta (Prymnesiophyta)	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae

Fonte: Raven, Evert e Eichhorn (1996); Richmond (2004); Barsanti e Gualtieri (2006); Bicudo e Menezes (2006); Lee (2008); Franceschini, Burliga, Riviers et al. (2010); Riviers (2010).

Divisões: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae), Chrysophyceae, Xantophyceae, Cryptophyta e Dinophyta (BICUDO; MENEZES, 2006).

De maneira similar ao que ocorre em outros grupos de organismos, a classificação das espécies de microalgas está em constante mudança, especialmente devido às técnicas moleculares com metodologias modernas como a amplificação de ácidos nucleicos e suas derivações, assim como o sequenciamento destes, fornecendo dados importantes para a análise filogenética.

Assim como para outros organismos, os estudos filogenéticos das microalgas são realizados utilizando uma abordagem polifásica, contemplando as características morfológicas, fisiológicas, a presença de pigmentos, cloroplastos e a utilização de diferentes metodologias moleculares (ANDERSEN, 2004; LOGARES et al., 2007; KOVAČEVIĆ et al., 2010).

1.6.1 Caracterização e identificação de microalgas: abordagem molecular

A identificação de microalgas é um grande desafio, porque técnicas microscópicas tradicionais baseadas nas características celulares, embora sejam úteis para uma rápida seleção de amostras por falta de marcadores morfológicos, não são suficientes para uma precisa identificação. Além de consumir tempo para utilizar técnicas microscópicas, exige mão de obra altamente especializada em taxonomia de microrganismos.

As técnicas moleculares desenvolvidas nas últimas três décadas têm proporcionado rapidez nos procedimentos de monitoramento, identificação e quantificação de amostras de fitoplâncton. A aplicação de métodos modernos de análise filogenética fornece informações para alterações contínuas na classificação das algas, especialmente com a disponibilização *online* de dados de sequenciamento de DNA. Os nomes e as relações filogenéticas inferidas para as microalgas, em prati-

camente todos os níveis taxonômicos, são alterados constantemente. Assim, pode ser impossível atribuir nomes que continuam a ser válidos ao longo do tempo ou que venham a ser universalmente aceitos, mesmo no momento em que são publicados (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; LEE, 2008).

Para estudos de taxonomia e evolução, o RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA, SSU – *small subunit*) foi proposto como marcador molecular, pois está presente em todos os organismos vivos; além disso, embora seja suficientemente conservado, apresenta regiões altamente variáveis e possui tamanho adequado, o que facilita e proporciona rapidez na sua análise (WOESE, 1987). O emprego desses genes nos estudos filogenéticos foi primeiramente publicado por Carl Woese et al. (1977; 1990) e são os mais amplamente utilizados e úteis para a definição de relações entre os organismos.

Além da SSU, os ribossomos possuem os genes da subunidade maior (LSU rRNA, LSU – *large subunit*), que são encontrados nos procariontes com rRNA 23S e nos eucariontes com 28S, também altamente informativos em termos genéticos. Contudo, o seu tamanho torna o sequenciamento mais dispendioso e demorado. Para facilitar a visualização, um esquema dos genes que codificam o 16S rRNA em microrganismos procariontes e do 18S rRNA em eucariontes é apresentado na Figura 1.3.

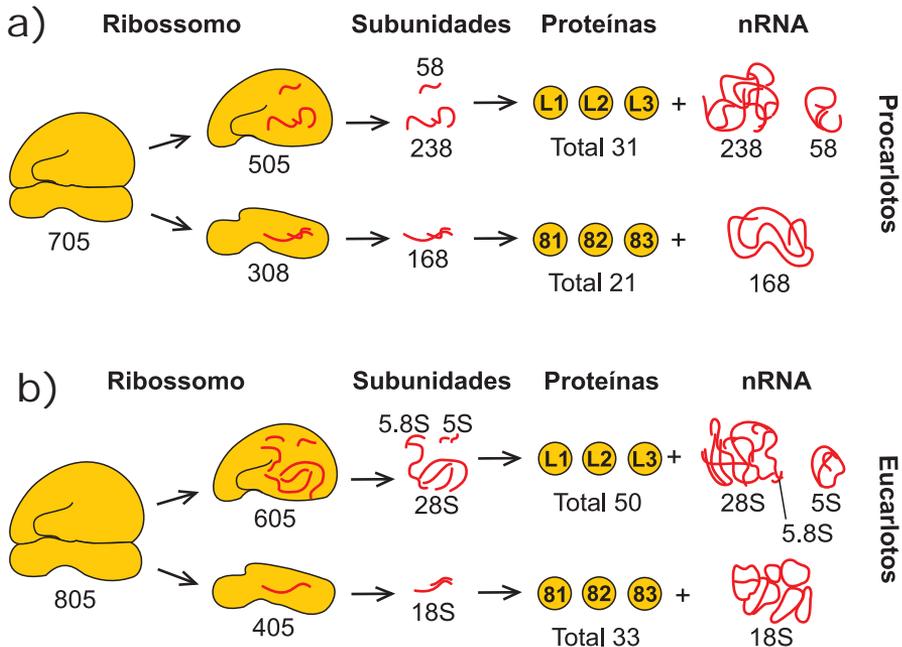
Nos anos 1980, o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que tem por fundamento básico a habilidade da enzima DNA polimerase de replicar *in vitro* uma sequência alvo de DNA específica (MULLIS et al., 1987) permitiu estudos de identificação e classificação de novos microrganismos. Isso, porque foram desenvolvidas outras metodologias baseadas na técnica de PCR, podendo-se citar as seguintes análises de DNA total ou de genes:

- *Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA);
- *Intergenic Spacer* (IGS);
- rep-PCR (REP, ERIC ou BOX);

- *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD);
- *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP);
- *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE);
- *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA).

Dentre outras vantagens, essas metodologias possibilitaram um entendimento mais amplo das relações filogenéticas entre os organismos, assim como sua melhor identificação e classificação.

Ebenezer et al. (2011) revisaram diversos métodos moleculares e seus usos práticos na detecção, quantificação e avaliação da diversidade de microalgas, e concordaram que os métodos aplicados para outros microrganismos poderiam ser



Fonte: Nelson e colaboradores (1986).

Figura 1.3. Esquema das subunidades ribossomais presentes em microrganismos. a) procaríotos; e, b) eucariotos.

adotados para os estudos de microalgas, pois esses métodos, geralmente, detectam moléculas universais. No caso de estudos de filogenia para identificar gêneros e espécies de microalgas, o emprego das diversas técnicas e metodologias de análise molecular apresentam muitas vantagens. A descrição resumida das etapas necessárias pode ser observada na Figura 1.4.

Para a amplificação do DNA, extraído na etapa 1, a escolha dos oligonucleotídeos para procarionte (16S rDNA) ou eucarionte (18S rDNA) deve ser feita apenas quando se tem certeza dos métodos morfofisiológicos que definiram de qual grupo a microalga pertence, caso contrário duas reações independentes de PCR (etapa 2) devem ser realizadas.

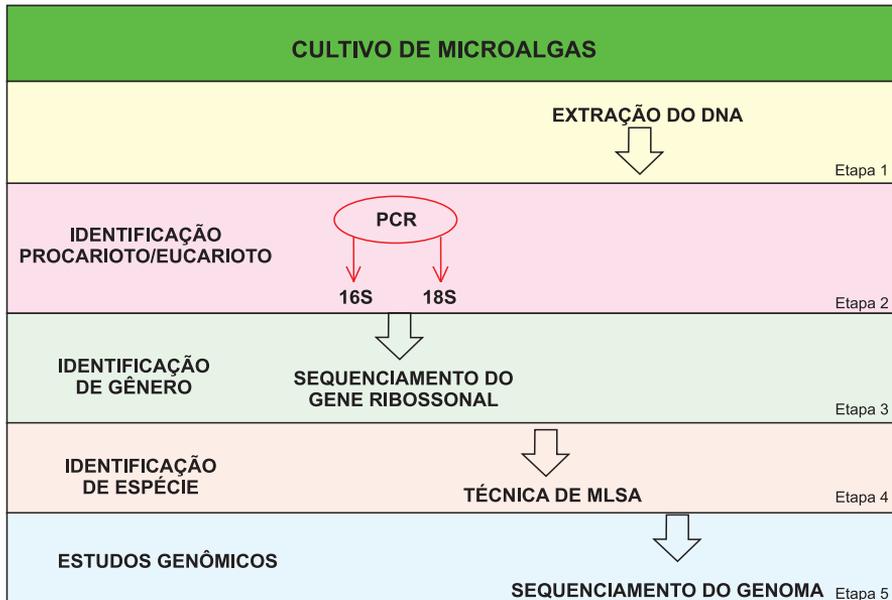


Figura 1.4. Esquema simplificado do planejamento dos estudos genômicos de microalgas para identificação de espécie a partir de um cultivo unialgal.

1.6.2 Métodos moleculares para caracterização de microalgas

Para as análises moleculares de microalgas, os procedimentos da extração de DNA são similares aos descritos para qualquer organismo bem como as diversas derivações de análises de PCR (Figura 1.5).

Embora a extração do DNA genômico de microalgas seja um processo simples, de boa eficiência e considerado de baixo custo, ainda há dificuldade para se obter a monocultura axênica de microalgas, o que dificulta a caracterização de maneira mais rápida. Portanto, a extração do DNA pode ser iniciada com células do isolado algal, preferivelmente a partir de uma cultura pura em placa de Petri com meio solidificado com ágar do que cultivada em meio líquido.

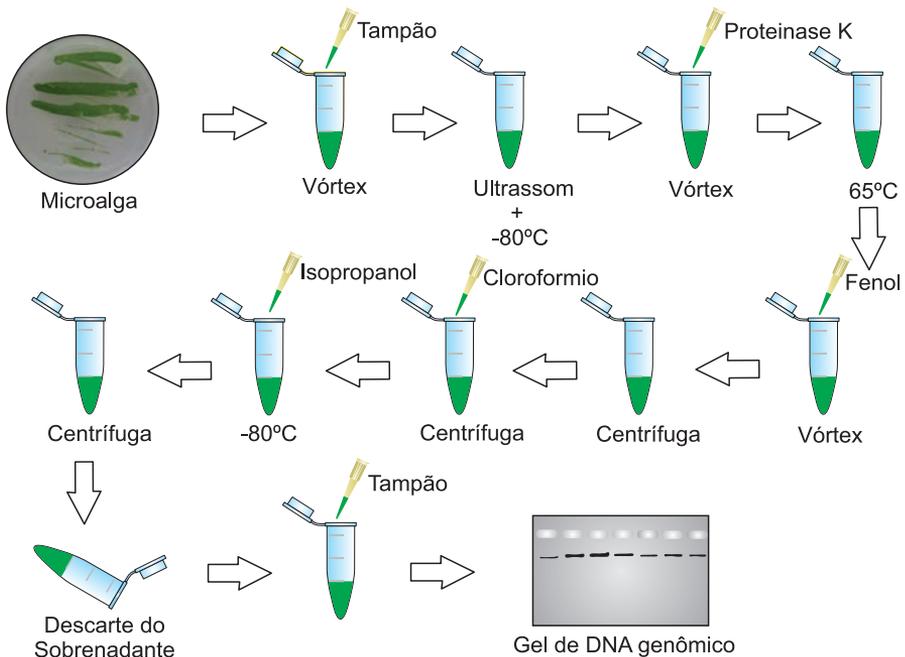


Figura 1.5. Fluxograma dos procedimentos para a extração do DNA genômico de microalgas.

Sem a sequência completa de DNA, a análise de pequenas sequências de genes conservados tem ajudado no entendimento da filogenia das microalgas. Geralmente, para os estudos de filogenia nas análises de sequenciamento, são escolhidas as regiões ribossomal DNA (rDNA), os genes de mitocôndria, os genes plastídios (*rbcl*) e os *internal transcript spacers* (ITS) (BUCHHEIM et al., 2012) e sequências de microssatélites (Tabela 1.7).

A identificação de estirpes de cianobactérias com base em dados morfológicos, muitas vezes, é congruente com suas análises moleculares baseadas em sequências do gene 16S rDNA. Um exemplo dessa equivalência foi apresentado por Furtado et al. (2009), com dez estirpes de cianobactérias dos gêneros *Synechococcus*, *Merismopedia*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix* e *Nostoc*, que foram isoladas de lagoa de estabilização de resíduos. Os autores sugeriram que as técnicas são complementares, uma vez que, dos seis gêneros identificados, apenas o gênero *Merismopedia* foi observado por inspeção microscópica direta, enquanto os outros quatro gêneros não foram detectados por essa técnica. Em um estudo do papel dos condicionantes ambientais na determinação da estrutura das comunidades de cianobactérias em solos de manguezais, Rigonato et al. (2013) também utilizaram as análises de sequências do 16S rRNA, observando, por exemplo, gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus*, além de sequências filiadas com 16S rRNA de cianobactérias não cultivadas.

Pela análise de PCR do DNA total de microalgas eucariontes e utilizando os oligonucleotídeos que amplificam a região 18S rRNA, com posterior sequenciamento do fragmento amplificado, foi possível identificar espécies como *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Desmodesmus communis*, *Scenedesmus rubescens*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus communis*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlamydomonas reinhardtii* e os gêneros *Chlorococcum* sp. e *Chlorococcum* sp. (RASOUL-AMINI, GHASEMI, MOROWVAT et al., 2009). Em outro trabalho, a amplificação

Tabela 1.7. Exemplos de sequências de oligonucleotídeos para amplificação das regiões conservadas, intergênicas e repetitivas de microrganismos.

Região	Sequências (5' - 3')	Referência
16Sf	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg et al. (1991)
16Sr	AAGGAGGTGATCCAGCC	
18Sr	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Bult et al. (1992)
18Sf	CACCTACGGAAACCTTGTTACGACTT	Hamby et al. (1988)
18Sr	TGATCCTTCGCAGGTTCCAC	LI et al. (2008)
18Sf	ACCTGGTTGATCCTGCCA	
18Sf	GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA	Rasoul-Amini et al. (2009)
18Sr	AGGGCAGGGACGTAATCAACG	
18SfChl	TGGCCTATCTTGTGGTCTGT	Moro et al. (2009)
18SrChl	GAATCAACCTGACAAGGCAAC	
28Sf	AGCGGAGGAAAAGAACTA	Abou-Shanab et al. (2011)
28Sr	TACTAGAAGGTTTCGATTAGTC	
ITS1	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	Hu, Zeng, Wang et al. (2004)
ITS2	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	
ITS3	(5'-GCAT CGATGAAGAACGCAGC-3')	Buchheim, Sutherland, Schleicher et al. (2012)
ITS4	(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	
ITS5	(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG G-3')	
BOX-A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic et al. (1994)

da subunidade maior do ribossomo (28S rRNA) mostrou a eficiência desse gene em microalgas isoladas de águas continentais. Produtos desses genes foram sequenciados e algumas espécies foram identificadas, podendo-se citar as espécies *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas pitschmannii*, *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas mexicana* (ABOU-SHANAB, MATTER, KIM et al., 2011).

A combinação da subunidade menor e maior do ribossomo é bastante recomendada para estudos filogenéticos, uma vez que o sequenciamento de um único gene pode acarretar equívocos. Uma extensa análise filogenética dos gêneros *Chlamydomonas* e *Chloromonas* foi realizada utilizando-se as subunidades menor e maior do ribossomo (HOHAM et al., 2002). Existem algumas pequenas sequências conservadas em mitocôndrias e cloroplastos, as quais podem ser utilizadas como ferramenta nos estudos filogenéticos (AHMAD et al., 2013). Esses autores utilizaram os “códigos de barra” do DNA de regiões conservadas do cloroplasto genômico, correspondendo ao 16S e 23S ribossomal, para a caracterização genética de clorófitas.

Outro método utilizado na determinação do genótipo de microrganismos procariontes é o que utiliza as regiões repetitivas no cromossomo. Essa metodologia avalia a presença de variações em todo o genoma e não apenas em um único gene. Um exemplo dessas técnicas moleculares para caracterização ao nível de estirpe (ou cepa) é a denominada BOX-PCR (VER-SALOVIC, SCHNEIDER, DE BRUIJN et al., 1994). Esses elementos repetitivos no DNA são observados no cromossomo dos microrganismos e servem como sítios para oligonucleotídeos na amplificação do DNA genômico (BRUIJN, 1992; KOEUTH et al., 1995). Este oligonucleotídeo é específico e desenhado para essas regiões repetitivas no genoma. A técnica que utiliza o BOX-PCR reúne várias vantagens: é rápida, de fácil execução e altamente discriminatória para subespécies ou estirpes, produzindo resultados que representam bem as análises baseadas na homologia DNA-DNA (BRUIJN, 1992).

Novas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para os estudos de taxonomia e filogenia de microrganismos, entre elas a análise conjunta de múltiplos genes (*loci*), os quais apresentam taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais, mas com um nível de conservação suficiente para conter informações evolutivas (STACKEBRANDT et al., 2002; GEVERS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009). Assim, a análise conjunta de múltiplos genes funciona como um tampão contra efeitos de recombinação ou transferência lateral quando um único gene é analisado. Genes utilizados como marcadores filogenéticos precisam ser conservados, estarem no genoma em uma única cópia, terem extensão nucleotídica aceitável para permitir o sequenciamento, e conter informações suficientes para que sejam correlacionados com o gene ribossomal 16S (THOMPSON et al., 2005; HEROEN VERBRUGGEN et al., 2009; RIBEIRO; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009). No caso das cianobactérias, genes C-ficocianina (*cpcB* e *cpcA*) e o espaço intergênico (IGS) mostram variações nas suas sequências, que permitem diferenciar espécies (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011).

A metodologia de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) consiste no sequenciamento e análise conjunta, após cada gene ser sequenciado separadamente e analisado como uma única sequência concatenada de, no mínimo, cinco genes. Na técnica MLSA, os genes utilizados para análise não precisam ser necessariamente constitutivos (*housekeeping*), mas devem estar presentes em todos os organismos em estudo (STACKEBRANDT; FREDERIKSEN; GARRITY et al., 2002; GEVERS; COHAN; LAWRENCE et al., 2005).

Além das análises moleculares visando à caracterização e identificação, as análises proteômica e de expressão gênica têm sido utilizadas para revelar funções de proteínas e genes importantes em microalgas. *Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde que tem a capacidade de acumular grandes quantidades de astaxantina em vesículas lipídicas extraplástí-

dicas, sob condições de estresse. A análise de expressão gênica em *H. pluvialis*, segundo Vidhyavathi et al. (2007), mostrou que a temperatura do meio de cultura influencia a regeneração de cistos vermelhos, o perfil de pigmentos e a expressão de diversos genes carotenogênicos transcritos nessa microalga.

A análise proteômica de extratos de proteína da *Haematococcus pluvialis* a partir de glóbulos de óleo citoplasmáticos revelou a presença de sete bandas de proteínas enriquecidas. A sequência desse aminoácido de proteína, denominado proteína *haematococcus óleo glóbulo* (HOGP), revelou homologia parcial com uma proteína de glóbulo de óleo de *Chlamydomonas reinhardtii*. A exposição das células de *H. pluvialis* a um meio deficiente em nitrogênio e com condições de alta luminosidade induziu o acúmulo de óleo. A proteína HOGP identificada em *H. pluvialis* – membro de uma nova família de genes que pode ser única para microalgas verdes – é a primeira associada à produção de óleo (PELED et al., 2011).

Em estudos de sequenciamento de cianobactérias, esses microrganismos têm apresentado genomas relativamente pequenos e com um número variado de plasmídeos, características encontradas nos procarióticos. O primeiro organismo fotossintetizante que teve seu genoma sequenciado foi a microalga do grupo das cianobactérias, do gênero *Synechocystis*, apresentando tamanho total do genoma circular de 3.573.470 pb (pares de base), com conteúdo de guanina e citosina (GC) de 47,7%. Nesse genoma, foram identificados 3.168 genes potenciais que codificam proteínas. Além do genoma circular, microalgas desse gênero apresentaram plasmídeos contendo de 44.343 pb a 119.895 pb (KANEKO et al., 1996; KANEKO et al., 1997; KANEKO et al., 2003; TAJIMA et al., 2011). O sequenciamento do genoma completo do gênero *Anabaena*, também do grupo das cianobactérias, apresentou tamanho de cromossomo de 6.413.771 pb com conteúdo de GC de 41,3% e seis plasmídeos com tamanho de 5.584 pb a 408.101 pb (KANEKO et al., 2001).

Microalgas eucariontes apresentam um número variável de cromossomos com genomas de tamanho bastante amplo. A microalga *Ostreococcus tauri*, um dos menores organismos eucariontes, possui 20 cromossomos e genoma de 12,6 Mb de tamanho, já a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* tem 17 cromossomos e genoma de 121 Mb de tamanho (BLANC et al., 2010).

Botryococcus braunii (Chlorophyta, Botryococcaceae) é uma microalga verde formadora de colônias e que produz grandes quantidades de hidrocarbonetos líquidos. Existem três linhagens diferentes de *B. braunii* bastante estudadas e que se distinguem com base no tipo de hidrocarboneto produzido e pela localização de onde foram coletadas. Enquanto a produção química de hidrocarbonetos da *B. braunii* tem sido bem estudada, pouco se sabe sobre sua biologia molecular. A análise de citometria de fluxo indicou diferenças nos tamanhos dos genomas dessas linhagens de *B. braunii*, variando de $166,0 \pm 0,4$ Mb a $211,3 \pm 1,7$ Mb (WEISS et al., 2011).

Para que os dados genéticos obtidos para uma espécie passem a compor o seu “código de barra” nos bancos de dados de sequências, são necessários sete requisitos (RATNASINGHAM et al., 2007):

1. Um nome de espécie;
2. Dados de número de catálogo e instituição na qual está armazenado;
3. Dados de coleção (coletor, coleção, data de coleta e local com as coordenadas geográficas – GPS);
4. Identificador da espécie;
5. Sequência *cox1* de pelo menos 500 pares de bases;
6. Oligonucleotídeos utilizados na análise de PCR para gerar os fragmentos (amplicons);
7. Depósito da sequência em bancos de dados públicos.

Rismani-Yazdi e colaboradores (2012) reportaram um estudo de análise quantitativa de expressão gênica para avaliar

“de novo” o transcriptoma da espécie *Neochloris oleoabundans*, com ênfase na complexa interação das rotas associadas à produção de triglicerídeos (TAG). Uma estirpe de *N. oleoabundans* foi cultivada em condições de meio de cultivo com e sem nitrogênio, e o conteúdo celular foi quantificado, incluindo os lipídeos totais e a clorofila. Os genes transcritos foram sequenciados e a expressão funcional das principais categorias de rotas relevantes e genes importantes foi quantificada por meio do mapeamento do transcriptoma. Esse estudo revelou como o estresse causado pelo nitrogênio resulta em maior produção de TAG para melhorar a produção de biocombustíveis.

Com base na análise filogenética de cinco espécies de *Nannochloropsis* e no mapa do transcriptoma de uma estirpe representativa, Wang et al. (2014) sugerem que há compartilhamento de características entre essas espécies e que ocorreu transferência horizontal e perdas de genes específicos para cada espécie.

1.7 Características das Divisões Cyanophyta e Chlorophyta

1.7.1 Divisão Cyanophyta

As cianobactérias são consideradas do grupo dos microrganismos *Gram-negativos*, pois sua parede celular, constituída de mureína, é recoberta por uma camada lipopolissacarídica. Além disso, as células podem apresentar envoltório mucilaginoso, comum a várias células (RÉZIG, 2010).

As microalgas (cianobactérias) pertencem ao domínio Bacteria e são filogeneticamente afastadas das algas eucariontes. Diferenciam-se das bactérias por possuírem clorofila *a* ao invés de bacterioclorofila e por apresentarem fotossistemas I e II, o que possibilita a realização de fotossíntese oxigênica, ao contrá-

rio das demais bactérias fotossintéticas. Alguns gêneros apresentam além da clorofila *a*, as clorofilas *b* ou *d*. Contêm, também, pigmentos acessórios e de proteção associados aos tilacoides como β -caroteno e outros carotenoides, ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina. A coloração azulada das células das cianobactérias se deve à presença de pigmentos azuis e vermelhos, que mascaram a coloração verde da clorofila. Quanto a forma das células, podem ser esféricas ou filamentosas (Figura 1.6).

Entre os produtos de reserva das cianobactérias podem-se destacar os grânulos de polifosfato e carboxissomos, as gotas de lipídeo e amido como reserva de carbono e a cianoficina como reserva de nitrogênio (FRANCESCHINI; PRADO; BURLIGA, 2010).

O talo das cianófitas pode ser unicelular, colonial ou filamentososo, falso ou verdadeiramente ramificado, com células diferenciadas e especializadas como heterócitos e acinetos nos gêneros *Nostoc* sp. e *Anabaena* sp. (Tabela 1.8).

Em espécies de microalgas cianófitas, a reprodução pode ocorrer por fissão binária, brotamento ou de forma parassexuada, nesta última ocorre recombinação genética, porém sem a fusão de gametas (FRANCESCHINI; BURLIGA; REVIERS et al., 2010).



Figura 1.6. Fotomicrografia de células de microalgas cianófitas. a) estirpe IPRSyn7061 (*Synechocystis* sp.); b) estirpe IPR7029.

Tabela 1.8. Morfologia de talos de diversos gêneros de microalgas da divisão Cyanophyta.

Talo	Gênero
Unicelular	<i>Synechocystis</i> e <i>Synechococcus</i>
Colonial	<i>Microcystis</i> e <i>Eucapsis</i>
Filamentoso simples, sem ramificações	<i>Lyngbia</i> e <i>Oscillatoria</i>
Filamentoso falso ramificado	<i>Scytonema</i> e <i>Tolypothrix</i>
Filamentoso ramificado	<i>Hapalosiphon</i> e <i>Stigonema</i>
Filamentoso homocitado	<i>Lyngbya</i>
Filamentoso heterocitado	<i>Nostoc</i> e <i>Anabaena</i>

Em relação à nutrição, as cianófitas podem ser heterotróficas ou autotróficas. As microalgas heterotróficas facultativas são capazes de se desenvolver tanto na presença quanto na ausência de luz, pois obtêm o carbono do meio, enquanto as microalgas fotoautotróficas obrigatórias só conseguem crescer em meio inorgânico, na presença de luz (LEE, 2008).

1.7.2 Divisão Chlorophyta

As clorófitas são microalgas eucariontes encontradas em quase todos os ambientes (REVIERS, 2010). A morfologia do talo das clorófitas é bastante diversificada (Tabela 1.9), sendo possível observar três tipos de talos predominantes: unicelular, colonial e filamentoso, com suas variações (BARSANTI; GUALTIERI, 2008).

Alguns tipos de morfologia celular de estirpes de microalgas do grupo das clorófitas de águas continentais são apresentados na Figura 1.7. Neste grupo de microalgas, pode-se observar que as células são de coloração verde, variam de unicelulares a coloniais e as formas de ovaladas a falcadas.

Tabela 1.9. Tipos de talo presentes em algas de diversos gêneros da divisão Chlorophyta.

Talo		Gênero
Unicelular		<i>Chlamydomonas</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Closterium</i> e <i>Chlorella</i>
Colonial		<i>Volvox</i> , <i>Pandorina</i> , <i>Desmodesmus</i> e <i>Scenedesmus</i>
Pseudofilamentoso		<i>Desmidium</i> e <i>Hyalotheca</i>
Filamentoso unisseriado	Simples	<i>Microspora</i> e <i>Spirogyra</i>
	Ramificado	<i>Stigeoclonium</i> e <i>Draparnaldia</i>
Filamentoso plurisseriado	Simples	<i>Schizomeris</i>
Pseudoparenquimatoso		<i>Coleochaete</i>
Parenquimatoso		<i>Ulva</i>
Alta complexidade		<i>Chara</i> e <i>Nitella</i>

Fonte: Franceschini et al. (2010).

A caracterização das estirpes quanto às avaliações morfológicas celulares (forma e tamanho) são importantes, principalmente no uso da chave de classificação taxonômica das microalgas. Outra função dessa caracterização celular é monitorar alterações e/ou contaminações cruzadas com outras estirpes quando dos repiques sucessivos na manutenção *in vivo* numa coleção.

As microalgas clorófitas possuem em suas células, acondicionados no interior de seus plastídios com duas membranas, os pigmentos fotossintetizantes clorofila *a* e clorofila *b* e o produto de reserva na forma de amido.

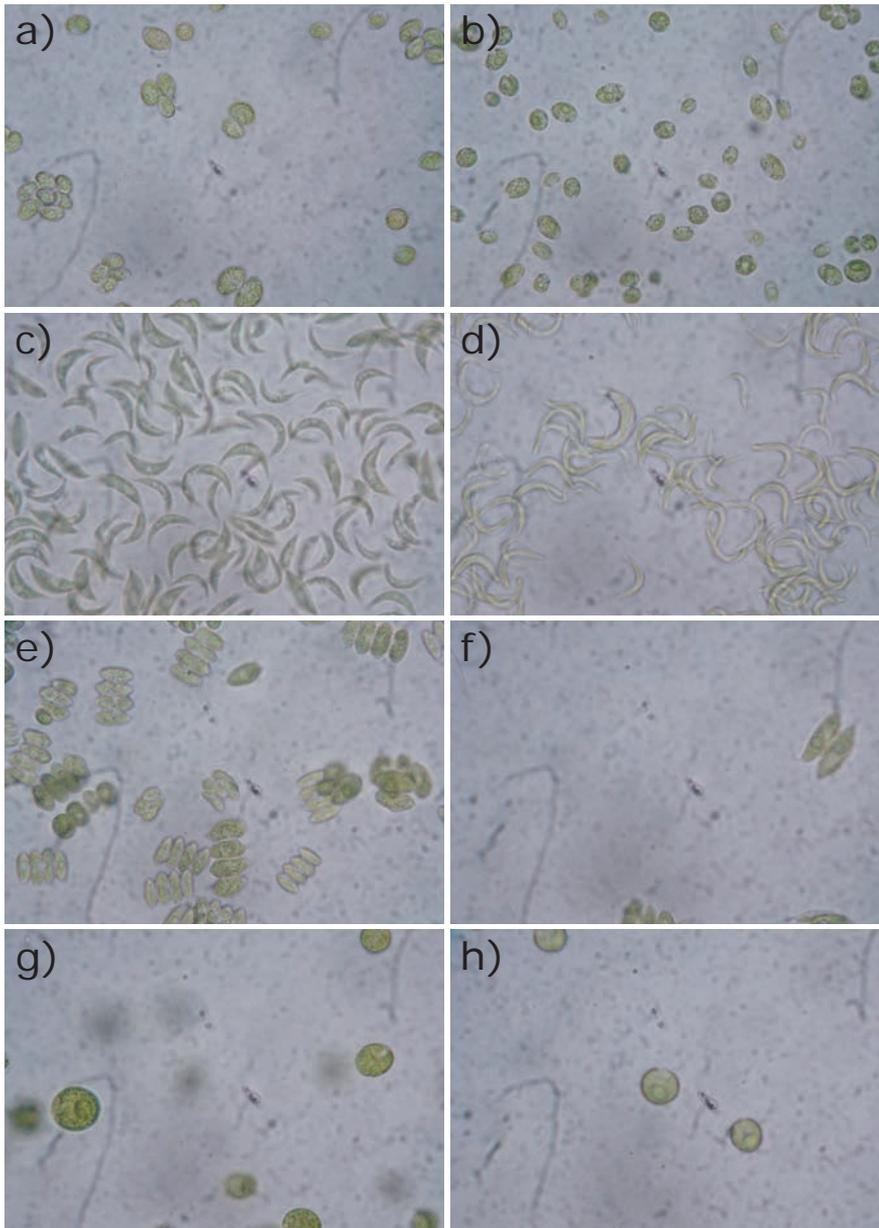


Figura 1.7. Fotomicrografia de tipos celulares encontrados em gêneros de clorófitas. a, b) unicelular oval; c, d) unicelular falcado; e, f) colonial; g, h) unicelular circular.

As células podem ser uninucleadas ou plurinucleadas, sendo os núcleos destas dispersos no citoplasma de células gigantes como nos entrenós de *Chara* e *Nitella* sp. (FRANCESCHINI; PRADO; BURLIGA, 2010). Os acinetos, esporos de resistência, também estão presentes em clorófitas da família Zygnematomphyceae.

A capacidade de movimentação por *gliding* também está presente nas clorófitas desmídias (*Zygnemaphyceae*, *Charophyceae*, *Staurostrum* e *Staurodesmus*). O estudo da velocidade de movimentação de três estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii* forneceu informações sobre a saúde da cultura e a acumulação total de ácidos graxos. Em microalgas, a análise dos dados de sequenciamento do RNA das estirpes de *C. reinhardtii* demonstrou que os processos biológicos de movimento celular e a geração de precursores de energia são geneticamente regulados, sugerindo avaliação indireta do teor de lipídeos por meio da medição cinética da natação (HANSEN et al., 2013).

A parede celular das clorófitas é composta de celulose e outros polímeros, podendo ser, ou não, calcificada (BICUDO; MENEZES, 2006; FRANCESCHINI; BURLIGA; REVIERS et al., 2010).

A reprodução em clorófitas ocorre de maneira assexuada ou sexuada, haplobionte haplôntico, haplobionte diplôntico e diplôntico (FRANCESCHINI; BURLIGA; REVIERS et al., 2010).

A divisão celular em microalgas eucariontes denominadas de fissão múltipla (não canônica) é caracterizada por um período prolongado durante o qual a célula cresce muitas vezes em relação ao tamanho original. Essa fase de crescimento é seguida por uma série de fases alternadas (n) de síntese DNA e mitose, produzindo células-filhas, de tamanho uniforme. O tamanho homeostático é mantido por dois mecanismos relacionados: a mitose e a interfase. A mitose regula o tamanho do número de divisões da célula-mãe, sendo, então, o tamanho das células-filhas similares, independentemente do tamanho da célula-mãe. Na interfase, a célula cresce e todos os constituintes celulares aumentam em número para que as células-filhas recebam a molécula completa de DNA e número suficiente de cópias

com todos os constituintes e organelas (TOMASELLI, 2004; BISOVA et al., 2005).

Os ciclos da célula eucariótica são movidos por um conjunto de genes específicos reguladores em linhagens que sofreram a perda, de duplicação ou divergência em diferentes táxons. Não se sabe até que ponto esses processos genômicos contribuem para diferenças nos mecanismos de regulação de divisão celular do ciclo celular entre os diferentes grupos taxonômicos. *Chlamydomonas reinhardtii* é uma microalga eucarionte unicelular e a caracterização dos genes que codificam o seu ciclo celular mostrou que o mecanismo de divisão celular é não canônico, denominado de fissão múltipla, e também que o ciclo das células reguladoras de proteínas são similares ao das encontradas em plantas superiores e metazoários (BISOVA; KRYLOV; UMEN, 2005).

O conhecimento do ciclo de vida celular das microalgas é importante na otimização de processos de cultivos, podendo alterar a quantidade e a composição da biomassa. Um exemplo desse efeito foi relatado no trabalho de Winter et al. (2013) para *Neochloris oleoabundans*, no qual foram observadas oscilações nos teores de amido, proteína e de pigmentos durante o ciclo celular. Os teores máximos em amido, proteínas e ácidos graxos foram obtidos antes da divisão celular. A produção de biomassa também foi afetada pelo ciclo celular e reduziu-se ao mínimo durante a divisão celular. Muito embora as condições de luz tenham sido constantes, a divisão celular sincronizada foi observada com as células em divisão por fissão múltipla durante a noite e esta alteração foi atribuída ao ciclo metabólico diário (relógio circadiano) de *N. oleoabundans*.

1.8 Microalgas Geneticamente Modificadas (GM)

Os estudos de transformação genética em microalgas ainda estão em fase inicial se comparados às pesquisas com culturas de vegetais de interesse econômico. Para melhorar o fenótipo quanto à produção de energia em microalgas eucariotas, sig-

nificantes avanços foram alcançados e utilizados para manipular o metabolismo central de carbono nesses organismos (RADAKOVITS et al., 2010), que deram enfoque nos melhoramentos das microalgas como uma plataforma na produção de bio-hidrogênio, alcoóis derivados de amido, bioetanol e alcanos. Amaro et al. (2011) sugeriram que em microalgas, os mecanismos de controle da expressão de genes ainda não estão completamente elucidados, dificultando a transformação nuclear eficiente, marcadores de genes selecionados e expressão estável da transgenia.

Cordero et al. (2011) relataram os procedimentos do isolamento e caracterização do gene fitoeno sintase (*CzPSY*), na microalga *Chlorella zofingiensis*, que está envolvido na primeira etapa da biossíntese de carotenoides. Este gene foi isolado e inserido em um vetor e expressado em *Chlamydomonas reinhardtii*. A expressão do gene *CzPSY* em *C. reinhardtii*, por transformação nuclear, levou ao aumento no nível transcrito correspondente ao *CzPSY*, bem como no teor dos carotenoides violaxantina e luteína, que foram 2,0 e 2,2 vezes maiores do que em células não transformadas. Este é um exemplo do uso da engenharia molecular na manipulação da via carotenogênica em microalgas, que pode aumentar a produtividade dos carotenoides para produção comercial.

As fitases microbianas são amplamente utilizadas como aditivo na ração de frangos de corte para aumentar a utilização do fósforo do fitato e para reduzir as perdas de fosfato inorgânico. Yoon e colaboradores (2011) aplicaram o gene *Appa* da fitase da *Escherichia coli* no genoma do cloroplasto da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* e obtiveram isolados recombinantes. Os autores sugeriram a expressão funcional de fitase em microalgas e o uso da transgenia como alternativas para obter aditivos alimentares com liberação de enzimas sem a necessidade de purificação de proteínas.

Para as culturas geneticamente modificadas, entretanto, monitoramento e manejo adaptativo deve ser exigido durante o cultivo em larga escala comercial (SNOW et al., 2005). Henley et al. (2013) também fazem diversas recomendações, incluindo protocolos rigorosos, sobre os riscos do uso de microalgas geneticamente modificadas. Esses autores ainda incluem outras sugestões, tais como desenvolver critérios referentes aos potenciais impactos ecológicos das microalgas geneticamente modificadas antes do seu cultivo em grande escala. Essas microalgas GM podem ser detectadas *in situ* por sequências de DNA únicas e intrínsecas e/ou inserir marcadores genéticos. Tem-se sugerido que a comunidade científica deve insistir em monitorar as pesquisas referentes aos cultivos massais de algas GM, mesmo na ausência de relevantes regulamentos.

Para o monitoramento de microalgas geneticamente modificadas, técnicas de biologia molecular são recomendadas, por exemplo a aplicação da técnica de PCR a partir de uma colônia tanto para DNA genômico quanto para cloroplasto para *Chlorella* sp. e outras microalgas, conforme procedimento relatado por Wan et al. (2011).

No Brasil, a regulação está por conta do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (CTNBIO, 1997). A legislação inicialmente foi para atender os vegetais, porém, estas normas se aplicam ao trabalho em contenção com microrganismos (incluindo bactérias, fungos, vírus, clamídias, riquetsias e micoplasmas), linhagens celulares, parasitos e organismos afins, geneticamente modificados.

Considerações Finais

O grupo artificial chamado de microalgas engloba indivíduos procariontes, como as cianobactérias, e eucariontes, como as clorófitas, mas que compartilham algumas características

em comum, tais como: fotossíntese oxigênica e crescimento na forma de curva exponencial de desenvolvimento, quando em cultivo estanque.

No Brasil, o conhecimento a respeito desse grupo tão diversificado de microalgas de águas continentais ainda é bastante escasso e dois fatores contribuem para isso, a necessidade de identificação acurada de espécies, que depende da análise conjunta de caracteres fenotípicos e genotípicos, e o grande número de espécies.

A diversidade morfológica dentro do grupo é grande, assim como a complexidade dos ciclos de vida. Embora a diversidade genética das microalgas venha sendo investigada por meio de diferentes técnicas moleculares, ainda não está totalmente explorada.

Os avanços nas análises moleculares voltados ao sequenciamento do genoma podem levar à identificação de novas espécies de microalgas, de maneira rápida e com menor custo, bem como de genes funcionais. Assim, esses avanços, provavelmente, revelarão o potencial biotecnológico desse grupo de microrganismos ainda pouco explorado, por exemplo, microalgas geneticamente modificadas para caracteres de interesse nas mais diversas áreas: saúde, alimentos, agricultura e aquicultura.

Referências

ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 3079-3085, 2011.

AHMAD, A. L. et al. DNA barcode and lipid analysis of new marine algae potential for biofuel. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 10-15, 2013.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, London, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.

- ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Burlington: Elsevier/Academic Press, 2005. 589 p.
- ANDERSEN, R. A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 91, n. 10, p. 1508-1522, 2004.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 301 p.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. General overview. In: _____. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006b. p. 1-34.
- BARSANTI, L. P. et al. The world of algae. In: EVANGELISTA, V. et al. (Ed.). **Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection**. Piza: Springer/NATO Public Diplomacy Division, 2008. p. 1-15.
- BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. (Ed.). **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. 502 p.
- BISOVA, K.; KRYLOV, D. M.; UMEN, J. G. Genome-wide annotation and expression profiling of cell Cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 137, n. 2, p. 475-491, 2005.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D. C.; PICCIN-SANTOS, V. Genetic diversity of Brazilian Cyanobacteria revealed by phylogenetic analysis. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic diversity in microorganisms**. Rijeka: InTech, 2011. p. 275-290.
- BLACKBURN, S.; PARKER, N. Microalgal life cycles: encystment and excystment. In: ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**: Elsevier Academic Press, 2005. Microalgal life cycles: encystment and excystment, p. 399-427.
- BLANC, G. et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 22, n. 9, p. 2943-2955, 2010.
- BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNbio). Instrução Normativa nº 7, de 09 de junho de 1997. Brasília, 1997.

- BRUIJN, F. J. D. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, 1992.
- BUCHHEIM, M. A. et al. Phylogeny of Oedogoniales, Chaetophorales and Chaetopeltidales (Chlorophyceae): inferences from sequence-structure analysis of ITS2. **Annals of Botany**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 109-116, 2012.
- BULT, C.; KÄLLERSJÖ, M.; SUH, Y. Amplification and sequencing of 16/18S rDNA from gel-purified total plant DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 273-284, 1992.
- CHEN, C.-Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam; v. 78, n. 0, p. 1-10, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- CORDERO, B. et al. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 2, p. 341-351, 2011.
- DE WINTER, L. et al. The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 313-320, 2013.
- EBENEZER, V.; MEDLIN, L. K.; KI, J.-S. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. **Marine Biotechnology**, New York, v. 14, p. 129-142, 2011.
- FRANCESCHINI, I. M. et al. (Ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 332 p.
- FRANCESCHINI, I. M.; PRADO, J. F.; BURLIGA, A. L. Diversidade. In: FRANCESCHINI, I. M. (Ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 73-213.

FURTADO, A. et al. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 627, n. 1, p. 195-209, 2009.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews**, New York, v. 3, p. 733-739, 2005.

GUOCE, Y. et al. Growth and physiological features of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in a Glucose-Mixotrophic Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 19, n. 1, p. 108-115, 2011.

GUPTA, V. et al. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) - Prospects and challenges. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 79-97, 2013.

HAMBY, R. K.; ZIMMER, E. A. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (*Poaceae*). **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 160, n. 1, p. 29-37, 1988.

HANSEN, T. J. et al. Algal swimming velocities signal fatty acid accumulation **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 110, n. 1, p. 143 -152, 2013.

HASHTROUDI, M. et al. Endogenous auxins in plant growth-promoting Cyanobacteria -*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 379-386, 2012.

HAUBNER, N.; SCHUMANN, R.; KARSTEN, U. Aeroterrestrial microalgae growing in biofilms on facades - Response to temperature and water stress. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 3, p. 285-293, 2006.

HENLEY, W. J. et al. Initial risk assessment of genetically modified (GM) microalgae for commodity-scale biofuel cultivation. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 66-77, 2013.

HEROEN VERBRUGGEN, M. A. et al. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 50, n. 3, p. 642-653, 2009.

HOEK, C. **Algae an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press. 1995. 623 p.

- HOHAM, R. W. et al. A combined 18S rDNA and RBCL phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (*Chlorophyceae*, volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats¹. **Journal of Phycology**, New York, v. 38, n. 5, p. 1051-1064, 2002.
- HU, Z. et al. An efficient method for DNA isolation from red algae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 161-166, 2004.
- KANEKO, T. et al. Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. **DNA Research**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 221-228, 2003.
- KANEKO, T. et al. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. **DNA Research**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 205-213, 2001.
- KANEKO, T. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Research**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 109-136, 1996.
- KANEKO, T.; TABATA, S. Complete genome structure of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 38, n. 11, p. 1171-1176, 1997.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 5, p. 408-418, 1995.
- KOVAČEVIĆ, G. et al. Morphological features and isoenzyme characterization of endosymbiotic algae from green hydra. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 284, n. 1, p. 33-39, 2010.
- LEE, D. H. Algal biodiesel economy and competition among bio-fuels. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 1, p. 43-49, 2011.
- LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. 561 p.
- LI, L. Y. et al. The spatial and temporal distribution of microalgae in the South China Sea: evidence from GIS-based analysis of 18S rDNA sequences. **Science in China Series C: Life Sciences**, Beijing, v. 51, n. 12, p. 1121-1128, 2008.

- LOGARES, R. et al. Phenotypically different microalgal morphospecies with identical ribosomal DNA: a case of rapid adaptive evolution? **Microbial Ecology**, New York, v. 53, n. 4, p. 549-561, 2007.
- LOPEZ, B. et al. Amendment of degraded desert soil with wastewater debris containing immobilized *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* significantly modifies soil bacterial community structure, diversity, and richness. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, n. 8, p. 1053-1063, 2013.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.
- MARTINS, M. D.; BRANCO, L. H. Z.; WERNER, V. R. Cyanobacteria from coastal lagoons of Southern Brazil: coccoid organisms. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 31-48, 2012.
- MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 20-39.
- MORO, C. V. et al. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of *Chlorophyceae* and *Bacillariophyceae* in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 17, p. 5729-5733, 2009.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MUTANDA, T.; KARTHIKEYAN, S.; BUX, F. The utilization of post-chlorinated municipal domestic Wastewater for Biomass and Lipid production by *Chlorella* spp. under batch conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 7, p. 1126-1138, 2011.
- NELSON, D.; COX, M. M. (Ed). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1986. 1009 p.
- PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Makron Books do Brasil, 1997. v. 1.

- PELED, E. et al. Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). **Lipids**, Berlin, v. 46, n. 9, p. 851-861, 2011.
- RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, n. 4, p. 486-501, 2010.
- RASOUL-AMINI, S. et al. PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 1, p. 129-136, 2009.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. **BOLD: The Barcode of Life Data System** (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- RAVEN, E.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 728 p.
- RÉZIG, S. H. Respostas morfológicas das algas à predação. In: FRANCESCHINI, I. M. et al. (Ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 275-284
- RIBEIRO, R. A. et al. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, Paris, v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- RIGONATO, J. et al. Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in south-east Brazil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 1103-1114, 2013.
- RISMANI-YAZDI, H. et al. Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 74, 2012.
- RIVIERS, B. D. Natureza e posição das algas na árvore filogenética do mundo vivo. In: FRANCESCHINI, I. M. (Ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 19-57.

- SCHLARLAB-RIDLEY, B. **Algal research in the UK**. [S.l.]: BBSRC, 2011.
- SHIELDS, L. M. Algae. In: ____ (Ed.). **Methods of soil analysis, chemical and microbiological properties**. Madison: ASA-SSSA, 1982. v. 2, p. 1091-1109.
- SNOW, A. A. et al. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. **Ecological Applications**, Washington, v. 15, n. 2, p. 377-404, 2005.
- STACKEBRANDT, E. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1043-1047, 2002.
- TAJIMA, N. et al. Genomic structure of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Strain GT-S. **DNA Research**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 393-399, 2011.
- THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5107-5115, 2005.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, 2004. p. 3-19.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.
- VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VIDHYAVATHI, R. et al. Differential expression of carotenogenic genes and associated changes in pigment profile during regeneration of *Haematococcus pluvialis* cysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, n. 4, p. 879-887, 2007.
- WAN, M. et al. An improved colony PCR procedure for genetic screening of *Chlorella* and related microalgae. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 8, p. 1615-1619, 2011.

WANG, D. et al. *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2014.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WEISS, T. et al. Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, New York, v. 23, p. 833-839, 2011.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 20, p. 249-278, 1989.

WOESE, C. R. Bacteria evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOESE, C. R. et al. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 47, p. 621-669, 1983.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

YOON, S.-M. et al. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 3, p. 553-563, 2011.

CAPÍTULO 2

FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE COLEÇÃO *EX SITU* UNIALGAL *IN VIVO*

Michele Regina Lopes da Silva
Alexandra Scherer
Diva Souza Andrade

Introdução

As microalgas (eucariontes e procariontes) continentais têm ocorrência nos diversos ambientes subaéreos, tais como solos, plantas, rochas, pelagem de animais e principalmente nos aquáticos, reservatórios de água potável, lagoas de estabilização de resíduos da agroindústria (água salobra), pesqueiros, represas, lagos e rios, situados praticamente em todas as longitudes e latitudes do planeta Terra (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; BICUDO; MENEZES, 2006). Em ecossistemas aquáticos, esse grupo de microrganismos é chamado de fitoplâncton e classificado como produtor primário de energia, constituindo a base da cadeia alimentar (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; LOURENÇO, 2006).

A *Convenção sobre a Diversidade Biológica*, aprovada em 1992 pelos países participantes da *Conferência das nações Unidas para o Meio Ambiente*, definiu o que são recursos biológicos e recursos genéticos e garante a soberania nacional na exploração da biodiversidade desses recursos (BRASIL, 2002). Como as microalgas são parte da diversidade biológica, as exigências da legislação brasileira devem ser seguidas quando da elaboração e implantação dos projetos de coleta para acessar ou formar as coleções *ex situ* fixadas (herbários) ou *in vivo*.

As algas são consideradas o maior grupo de organismos vivos, apresentando enorme diversidade, embora ainda com limitado conhecimento acerca das suas relações filogenéticas (ANDERSEN, 2004). O isolamento e manutenção de estirpes de cianobactérias em coleções têm possibilitado estudos genéticos de caracterização e de sequenciamento do genoma (BITTENCOURT-OLIVEIRA; PICCIN-SANTOS, 2011; BENCH et al., 2013) e também com microalgas eucariontes (RADAKOVITS; JINKERSON; DARZINS et al., 2010; WEISS; JOHNSTON; FUJISAWA et al., 2011; RISMANI-YAZDI; HAZNEDAROGLU; HSIN et al., 2012; SUN et al., 2013).

Os estudos genéticos de microalgas isoladas fornecem dados importantes que podem ser aplicados na transformação

genética para a produção de biocombustíveis e outros produtos biotecnológicos da biomassa, bem como em estudos da ecologia de populações naturais.

Em agosto de 2005, no *VIII Congresso Internacional de Ficologia*, em Durban, na África do Sul, as espécies de microalgas e macroalgas foram consideradas ameaçadas de extinção e os especialistas sugeriram estratégias para assegurar uma proteção realista, incluindo o potencial uso de coleções de culturas *ex situ* na conservação de algas e a aplicação da legislação para proteger o habitat e as espécies. O conceito para o grupo de microalgas de que “todas estão em toda parte” contradiz a evidência de que algumas espécies têm ocorrências restritas e que na conservação deve-se levar em conta a sua biogeografia (BRODIE et al., 2009). A conservação *ex situ*, na forma de coleções de culturas mantidas criopreservadas vem crescendo e a legislação é considerada a melhor estratégia para proteger as algas. Além disso, o conhecimento da taxonomia e uma abordagem global são vitais para a conservação das algas (BRODIE; ANDERSEN; KAWACHI et al., 2009).

Acervos de microalgas altamente especializados, por exemplo, com um único gênero ou mesmo uma única espécie têm sido mantido por instituições, visando estudos do espécime mantido *in vivo* (LOURENÇO, 2006). Algoteca foi definida por Guimarães e colaboradores (2009) como: coleção de algas identificadas, rotuladas e ordenadas, mantidas em condições de iluminação e meios de cultura adequados. Lourenço (2006) destaca que para ser considerada coleção de culturas, essa deve receber depósito de microalgas *in vivo* e passar por manutenção constante do material biológico, com curadoria.

Nesta publicação, o termo adotado para o conjunto de algas mantidas *ex situ* é de coleção de microalgas. Estima-se que mais de 11.000 estirpes de microalgas são mantidas *in vivo* em coleções de culturas no mundo todo, constituindo um banco de biodiversidade com importância internacional (OSORIO et al., 2004).

No Brasil, Lourenço e Vieira (2004) citam 37 instituições que mantêm coleções de microalgas, com os respectivos números de estirpes do acervo e o pesquisador responsável. Essas informações foram atualizadas por Lourenço (2006), observando maior número de instituições (44) com Coleções de microalgas no Brasil.

Neste capítulo serão mencionados exemplos de coleções de microalgas cadastradas na Federação Mundial de Coleções de Culturas (*World Federation Collection Culture – WFCC*). Essas coleções estão disponíveis *online* e são importantes, principalmente devido à manutenção dos recursos genéticos.

2.1 Objetivos e Normas para o Estabelecimento de uma Coleção

Quando do estabelecimento de qualquer coleção de microrganismos, inclusive de microalgas, é de fundamental importância uma discussão prévia e uma análise cuidadosa com a instituição mantenedora, sobre seus objetivos a longo prazo, relativos ao âmbito das suas explorações e à gama de serviços externos que são previstos. Além disso, muitas vezes é importante e útil se estabelecer objetivos mais específicos para a coleção no curto prazo, relativos a um período de 3 a 5 anos.

Sugere-se, também, contemplar uma política de adesões claramente definidas sobre os grupos de microrganismos, classe, gêneros, espécies e o número de novas estirpes a serem incluídas na coleção, bem como os prazos para a instalação de novos equipamentos e serviços. Se este planejamento não for realizado e muitas estirpes forem aceitas sem critérios, provavelmente ocorrerão implicações financeiras no longo prazo. A capacidade de armazenamento, a disponibilidade de pessoal e recursos financeiros também devem ser considerados, para não sobrecarregar e comprometer a qualidade dos serviços prestados.

A criação de redes colaborativas com outras coleções similares é essencial, pois permitem uma adesão política coordenada a nível regional, nacional ou global. A adesão a quaisquer normas de segurança em vigor é obrigatória (WFCC, 2010). As informações referentes ao funcionamento de uma coleção de acordo com a legislação e as normas das convenções internacionais podem ser encontradas em diversas publicações e endereços eletrônicos relacionados ao tema. A importância da biodiversidade e a necessidade de preservação e conservação justificam todo o processo de regulamentação em desenvolvimento no país. Segundo o Ministério do Meio Ambiente, a biodiversidade brasileira é responsável por cerca de 45% do PIB brasileiro e corresponde a 31% das exportações do país (LIMA et al., 2013).

No Brasil, com a finalidade de auxiliar os usuários no cumprimento das regulamentações referentes às coletas, transporte e depósito de material biológico e/ou patrimônio genético, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) apresenta no seu portal *online* algumas Instruções Normativas e Resoluções do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), que incidem sobre as atividades das coleções biológicas, assim como a Medida Provisória 2.186/2001 do CGEN. Adicionalmente, também são disponibilizados os Guias da *World Federation of Culture Collection* (WFCC) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) referentes às boas práticas para Coleções de Culturas de Microrganismos e para Centros de Recursos Biológicos (CRBs), respectivamente, assim como a Nit-Dicla 061 (FIOCRUZ, 2014).

Atualmente, algumas coleções de microalgas têm sido criadas ou adaptadas para atender objetivos específicos, tais como o de formar um banco de estirpes selecionadas para uso na produção de bioenergia. Elliott e colaboradores (2012) relataram o estabelecimento de uma coleção de microalgas no Sudoeste dos Estados Unidos, consistindo de isolados obtidos de ecos-

sistemas próximos às áreas geográficas com potenciais para o cultivo em larga escala. Os autores destacaram que na busca de matéria-prima promissora para a produção de bioenergia, as estirpes foram pré-selecionadas com base em técnicas de separação de células de alto rendimento, incluindo o acúmulo de lipídeos neutros e taxas de crescimento, ressaltando, ainda, a importância das técnicas de criopreservação para o armazenamento desses microrganismos a longo prazo.

No Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a Coleção IPR de Microalgas foi formada para atender à demanda do Projeto Microalgas, em Convênio com a Companhia Paranaense de Energia (COPEL), visando obter estirpes produtoras de óleo e coprodutos de interesse biotecnológico. Essa coleção foi estabelecida por meio de coletas realizadas em águas continentais no Estado do Paraná e também por meio de aquisição e doações de espécimes provenientes de diferentes instituições.

2.2 Tipos de Coleções *Ex Situ* de Microrganismos

O estabelecimento e a manutenção de coleções *in vivo* de microrganismos requer cuidados especiais e tecnologias adequadas para evitar perdas de material biológico, que são de vital importância para os países, pois representam uma fonte de material genético para estudos básicos de diversidade e/ou aplicados nas mais diversas áreas (DAY et al., 1999; DAY et al., 2008; SOLA et al., 2012; ABURAI et al., 2013). As coleções podem ser individuais ou fazerem parte de Centros de Recursos Biológicos (CRBs), dos quais fazem parte coleções depositárias de organismos, DNA e até genes específicos.

As funções básicas dos CRBs são:

- a conservação da biodiversidade;
- o fornecimento de material biológico para a pesquisa;
- a preservação (depósito) de material envolvido em processos de patente;

- o treinamento de pessoal;
- a educação;
- a informação para a formulação de políticas públicas;
- a informação para o público em geral.

Uma classificação básica das coleções de microalgas fornecida por Lorenz e colaboradores (2005) destaca três tipos:

- Coleções diversificadas com objetivos de pesquisa e educação;
- Coleções com espécies para estudos aplicados;
- Coleções com estirpes geneticamente estáveis e definidas para estudos biotecnológicos para a transformação genética.

De acordo com as atividades desenvolvidas, as coleções são classificadas como:

- de trabalho: aquelas resultantes de atividades de pesquisa, mantidas pelo próprio pesquisador;
- institucionais: aquelas que reúnem várias coleções e atendem a vários pesquisadores – geralmente não possuem curadoria profissional e não recebem recursos para a prestação de serviço especializado;
- de serviço: aquelas que mantêm acervos abrangentes e curadoria profissional, além de receberem apoio financeiro governamental e/ou externo para a prestação de serviços.

Além disso, as coleções ainda podem ser divididas entre as que mantêm material biológico fixado e as que mantêm o material biológico viável criopreservado, liofilizado, encapsulado ou em subcultivo periódico.

2.2.1 Coleções de microalgas com material fixado

As coleções de microalgas com material fixado possuem importância científica e também valor histórico. Por meio delas é possível obter informações a respeito da biodiversidade atual ou do passado, avaliar impactos ambientais, definir áreas de preservação, obter testemunhas para consultoria ambiental, realizar estudos taxonômicos e outros serviços. Nesse tipo de coleção, o material fixado pode ser mantido em lâminas permanentes ou em frascos. No primeiro caso, o material algal é fixado e montado sobre lâminas cobertas com resinas, tais como: Naphrax, Bálsamo-do-Canadá, Permout e outros que, em seguida, são cobertas com lamínula e vedadas com massa-de-luto ou esmalte incolor. As lâminas são, então, acondicionadas em caixas tipo laminário. No segundo, as microalgas são depositadas em frascos contendo solução fixadora e o material fixado é, então, devidamente descrito, registrado e acondicionado em armários (BICUDO; MENEZES, 2006).

As células de microalgas podem ser preservadas em diferentes compostos fixadores, assim, a escolha do fixador depende da espécie, da origem e também do objetivo da utilização do material. Os principais agentes usados para fixação são alcoóis, formol, ácido crômico, ácido pícrico, permanganato de potássio, ácido acético e ácido ósmico. A função desses produtos fixadores é paralisar processos vitais e impedir a ruptura das células, além de estabilizar componentes celulares, preparando o material para a conservação permanente. O volume do fixador deve ser cerca de dez vezes o volume do material biológico a ser fixado e, em alguns procedimentos de preservação permanente, é requerida a lavagem prévia do material a ser fixado com acetona ou etanol.

O álcool é um dos mais antigos fixadores, mas apesar de penetrar rapidamente nos tecidos, provoca contração e endurecimento, além da extração de lipídeos. O formol é considerado um dos melhores fixadores, pois preserva a estrutura delicada do citoplasma, causa pequena contração, reduz a solubilidade de lipídeos, mas também endurece o material. O ácido acético

penetra rapidamente nos tecidos, preserva a estrutura nuclear e cromossomal e tem tendência a amolecer os tecidos. A solução ideal de fixadores de microalgas ainda não existe. Assim, nenhum dos agentes fixadores reúne todas as qualidades que um bom fixador deve ter, sendo necessária a utilização de misturas fixadoras (MACEDO, 1997; BICUDO; MENEZES, 2006). Na Tabela 2.1 são apresentadas a composição e concentração de alguns compostos/soluções utilizados na fixação de células de microalgas e as vantagens e desvantagens do seu uso.

As principais soluções fixadoras podem ser classificadas em três tipos: ácidas, básicas e neutras. Para a preservação da cromatina e dos plastos das células são indicados os fixadores ácidos, com pH abaixo de 4,6, podendo citar a solução de formalina, álcool, ácido acético (FAA) (Tabela 2.1). Enquanto as mitocôndrias, plastos, citoplasma, vacúolos e cariolina são preservados com os fixadores básicos (bicromato de potássio), com pH acima de 5,0. A formalina neutra tamponada e o lugol neutro são exemplos de soluções fixadoras neutras. Bicudo e Menezes (2006) citam que diversos pesquisadores nos Estados Unidos e Europa preferem a solução de formalina, álcool e ácido propiônico (FAAP) para fixar e preservar microalgas de águas continentais, devido ao tempo pelo qual se pode manter o material para estudos morfológicos e taxonômicos sem dano em suas estruturas.

Para as microalgas, entre as soluções fixadoras mais utilizadas estão a formalina, com concentração variando de 3% a 5%, o lugol neutro, o glutaraldeído a 2,5%, o etanol 70% e a solução de Transeau. Independentemente do agente fixador e da concentração, ou seja, da solução fixadora e preservativa, recomenda-se que o material biológico seja fixado o mais breve possível após a coleta e, no máximo, até 24 h depois e armazenado ao abrigo da luz para manter sua coloração mais próxima à natural. A adição de 4% de sulfato de cobre e algumas gotas de glicerina pura à solução fixadora e preservativa permite à microalga conservar a coloração verde por mais tempo e reduz a evaporação, respectivamente (BICUDO; MENEZES, 2006; GUIMARÃES; AMARAL; SANTOS et al., 2009).

Tabela 2.1. Composição e concentração de alguns fixadores de células de microalgas e suas vantagens e desvantagens.

Fixadores	Composição e concentração	Vantagens	Desvantagens
Formalina	Formaldeído 37% (formalina 100%), Formaldeído 40% neutralizado com tetraborato de sódio (20 g L ⁻¹) ou bicarbonato de sódio (5 g L ⁻¹), chegando a uma concentração final na amostra de 2% a 5%.	Duração de muitos anos, não altera coloração da célula.	Distorce o formato das células de flagelados nus, ocorre perda de flagelo e é altamente tóxico.
Formalina, álcool, ácido acético (FAA)	100 mL de etanol 50%, 6,5 mL de formalina e 2,5 mL de ácido acético glacial.	Preserva flagelos e é um bom fixador preservativo.	Não deve usar FAA sobre algas calcificadas, tais como <i>Acetabularia</i> , pois o ácido irá danificar o espécime.
Formalina, álcool, ácido propiônico (FAP)	100 mL de etanol 50%, 6,5 mL de formalina e 2,5 mL de ácido propiônico.	Permite fixação melhor do que o ácido acético.	Distorce os flagelos.
Solução de Transeau	6:3:1; 6 partes de água, 3 partes de álcool etílico (95°GL) e 1 parte de formalina (solução aquosa de formol a 40%).	Mantém as características da célula, como flagelos e plastos.	Utiliza grande volume.

Continua.

Tabela 2.1. Continuação.

Fixadores	Composição e concentração	Vantagens	Desvantagens
Solução aquosa de lugol (a)	10 g de iodo puro, 20 g de iodeto de potássio, 20 mL de ácido acético glacial e completar com água destilada para 200 mL.	Preserva flagelo e aumenta o peso das células para sedimentação.	Dissolve frústulas de diatomáceas mais delicadas e as escamas de silício dos flagelados, além de alterar o biovolume de cianobactérias.
Solução aquosa de lugol (b)	Preparar separado: solução nº. 1, contendo 10 g de iodeto de potássio e 100 mL de água destilada. Solução nº. 2, contendo 5 g de iodo cristalino e 10 mL de ácido acético glacial. Misturar as duas soluções e manter no escuro e com baixa temperatura.	O iodo fixa e preserva bem, além de tornar visível o amido presente na célula.	Acima de 10% em relação ao volume da amostra, dificulta o discernimento das estruturas celulares pelo escurecimento.
Álcool	Etanol ou Isopropanol a 70% para estocagem permanente.	Um bom preservativo.	Provoca encolhimento e endurecimento, além da extração de lipídeos.

Continua.

Tabela 2.1. Continuação.

Fixadores	Composição e concentração	Vantagens	Desvantagens
Glutaraldeído (dialdeído glutárico, pentanedial) 2,5%	A solução, geralmente, contém de 47% a 53% v/v de glutaraldeído, miscível em água, álcool e solventes orgânicos, ácidos (pH de 3 a 4). Preparar com tampão fosfato pH entre 7,5 e 8,5 quimicamente estável por 14 dias.	Preserva as estruturas celulares com qualidade e não é corrosivo.	Deve-se evitar o contato direto.

Fonte: Kraus e Arduim (1997); Macedo (1997); Bicudo e Menezes (2006); Brandão et al. (2011) e *National Museum of Natural History* (2014).

Para estudos genéticos, as células de microalgas em meio líquido podem ainda ser utilizadas, desde que devidamente fixadas e armazenadas (GODHE et al., 2002; AUINGER et al., 2008). Todavia, deve-se considerar o tipo de fixador utilizado, a espécie de microalga e possíveis modificações celulares. Hawkins e colaboradores (2005) observaram que o lugol iodine alterou o biovolume de quatro cianobactérias de água doce: *Mycrocystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Aphanocapsa incerta*.

O tempo de fixação é variável, pois depende do tipo de fixador, das dimensões do material (células e tecidos) e da resistência do material à penetração do fixador (KRAUS; ARDUIM, 1997; MACEDO, 1997). A escolha da solução fixadora e preser-

vativa irá depender de uma série de fatores como, por exemplo, do grupo de microalgas a ser estudado e do tipo de estudo a ser desenvolvido, bem como da disponibilidade orçamentária. Independentemente do tipo da solução fixadora e preservativa utilizada, a fixação do material deve ocorrer no máximo, até 24 h após a coleta, especialmente no caso de material concentrado (BICUDO; MENEZES, 2006).

2.2.2 Coleções de microalgas *in vivo*

Coleção de culturas *in vivo* pode ser definida como um conjunto de estirpes de microalgas mantidas de maneira axênica, ou não, criopreservadas, liofilizadas ou em subcultivo, o que requer a manutenção constante para proporcionar condições adequadas para a viabilidade desses microrganismos. Embora a manutenção de estirpes viáveis de microalgas em coleções axênicas seja onerosa, diversas instituições mantêm esse tipo de coleção, em função de sua importância em manter material genético vivo para estudos diversos. Dessa forma, protocolos com os procedimentos de manutenção e transferências dos cultivos são a base de uma coleção de organismos vivos.

A finalidade de qualquer método de manutenção é garantir ao máximo a vitalidade das células, a quantidade de células viáveis e, principalmente, proporcionar a estabilidade genética do microrganismo pelo maior tempo possível, evitando a formação excessiva de mutações que alterem suas características. Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de conservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da técnica, na importância do acervo e, principalmente, na capacidade laboratorial e na disponibilidade de equipamentos. Um bom método de preservação de microalgas, para células procariontes e eucariontes, deve unir eficiência, simplicidade, rápida execução e baixo custo. Porém, devido às particularidades de cada um desses microrganismos, torna-se

impossível reunir todas estas características em um só método em uma coleção de microalgas de águas continentais, especialmente quando ainda não estão identificadas quanto à filogenia.

Com o advento da informática e das redes virtuais em tempo real, as coleções passaram a ser organizadas em bancos de dados dentro de plataformas computacionais específicas para coleções científicas e ligadas a redes internacionais pela internet. Tal processo contribui para a tomada de decisões, definição de políticas públicas e para a integração entre a informação produzida por pesquisadores da biodiversidade e gestores de programas governamentais (INPA, 2014). Na Tabela 2.2 é apresentada uma lista de coleções de microalgas *in vivo* credenciadas na Federação Mundial de Coleções (*The World Federation for Culture Collections – WFCC*).

Tabela 2.2. Lista de coleções de microalgas de águas continentais disponíveis *online*.

Coleção/Database	Instituição/País
ACOI – Coimbra Collection of Algae	Department of Botany, University of Coimbra, Portugal
Algaebase	National University of Ireland, Galway
ANACC – Australian National Algae Culture Collection	CSIRO Marine and Atmospheric Research, Tasmania, Australia (formerly CCLM – CSIRO Collection of Living Microalgae); Australia.
APCC – Antarctic Protist Culture Collection	Woods Hole Oceanographic Institution, Massachusetts (on Cape Cod), USA
ATCC – American Type Culture Collection	GCStandards, USA

Continua.

Tabela 2.2. Continuação.

Coleção/Database	Instituição/País
CC – Chlamydomonas Center	An Online Informatics Resource for Chlamydomonas, USA
CCMEE – Culture Collection of Microorganisms from Extreme Environments	Center for Ecology and Evolutionary Biology, The University of Oregon, USA
CCMP – The Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton	Aguafresca Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, Maine, USA
UTEX – Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin	University of Texas at Austin, Austin, USA
Loras College Freshwater Diatom Culture Collection	Loras College Freshwater Diatom Collection was transferred in 2006 from Loras College, Iowa, USA para UTEX
CCAC – Culture Collection of Algae at the University of Cologne	Institut, Universität zu Köln, Cologne, Alemanha.
CCAM – Culture Collection of Algae Marburg	Department of Cell Biology and Applied Botany, Philipps-University Marburg, Alemanha.
CCALA – Culture Collection of Algal Laboratory	Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, TREBON
CCAP – Culture Collection of Algae and Protozoa	Marine Laboratory, Oban, Argyll, Scotland, Reino Unido
CCCryo – Culture Collection of Cryophilic Algae	Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering IBMT in Potsdam-Golm
CCBA – Culture Collection of Baltic Algae	Polônia

Continua.

Tabela 2.2. Continuação.

Coleção/Database	Instituição/País
CCCM – Canadian Center for the Culture of Microorganisms	Department of Botany, University Boulevard, Vancouver, B.C. Canadá
CPCC – Canadian Phycological Culture Centre	Department of Biology at the University of Waterloo (formerly UTCC – University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria)/, Canadá
ECCO – European Culture Collections Organisation	Europa
FACHB – Freshwater Algae Culture Collection of the CAS	Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences(CAS), Wuhan, China
HCC – Hawaii Culture Collection	Marine Bioproducts Engineering Center (MarBEC) at the University of Hawaii
NIES Collection	Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies (MCC NIES), Onogawa, Tsukuba, Ibaraki, Japão
WDCM – WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms	World Data Centre for Microorganisms, Yata, Mishima, Shizuoka, Japão
PCC – Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria	Institut Pasteur, Paris, França
RCC – Roscoff Culture Collection	Station Biologique, Roscoff, França
SAG – Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen	Culture Collection of Algae (SAG) at the Universität Göttingen, Alemanha
SCCAP – Scandinavian Culture Centre for Algae and Protozoa	Institute for Biology, University of Copenhagen, Dinamarca

Continua.

Tabela 2.2. Continuação.

Coleção/Database	Instituição/País
BCCUSP – Brazilian Cyanobacteria Collection	University of São Paulo, Brasil
UFScarCCWDCM 835Freshater Microalgae Collection Cultures, Brazil	Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil
Coleção IPR de Microalgas	Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Brasil
WFCC – World Federation for Culture Collections	-

Regra geral, solicita-se que seja citado o número e a codificação *acronomin* (sigla) da estirpe na coleção e que as culturas não sejam redistribuídas para outros usuários sem a anuência do curador da coleção de origem. Restrições especiais são colocadas para as estirpes produtoras de toxinas, exigindo que o formulário sobre as condições da forma de liberação de tóxico deve ser preenchido, assinado e devolvido ao curador antes das culturas serem enviadas. No Canadá, por exemplo, a *Canadian Phycological Culture Centre* (CPCC), da Universidade de Toronto, tem prestado serviços de depósito nas condições citadas anteriormente (ACREMAN, 2004). No Brasil, atualmente, não há uma coleção de serviço específica de microalgas, entretanto, diversas universidades e instituições de pesquisa mantêm coleções, principalmente, para seus trabalhos de pesquisa e estudos acadêmicos (LOURENÇO, 2004).

2.3 Formação de uma Coleção de Microalgas *In Vivo*

O interesse na formação de coleções de microalgas *in vivo* (com células viáveis) é proveniente de várias demandas:

1. Pesquisas acadêmicas, pois as microalgas constituem o maior e mais diverso grupo de procariontes e eucariontes que realizam fotossíntese aeróbica;
2. O uso de microalgas como fonte de produtos bioquímicos úteis para a nutracêutica e outros fins;
3. O alto teor de nitrogênio na biomassa de alguns gêneros, especialmente *Arthrospira*, para utilização como fonte proteica na alimentação humana e/ou animal;
4. A capacidade de um grande número de espécies em fixar nitrogênio atmosférico, o que tem implicações na manutenção da fertilidade dos ecossistemas naturais e cultivados, especialmente em arrozais de zonas tropicais e subtropicais úmidas.

Tem crescido, nas últimas décadas, o interesse pela formação de coleções contendo espécies de microalgas selecionadas para a produção de biomassa e lipídeos para a produção de bioenergia.

As estirpes de microalgas isoladas de amostras coletadas no ambiente podem ser utilizadas em diferentes tipos de estudo. Assim, para o estabelecimento de uma coleção é necessário definir previamente os objetivos e com isso o ambiente do qual o material será coletado, para que a obtenção das estirpes ocorra de acordo com os espécimes de microalgas desejados.

2.3.1 Coleta de material biológico

Neste capítulo é abordada apenas a coleta em ambientes aquáticos continentais, visando obter material biológico viável para isolamento de microalgas.

Antes de iniciar a coleta, deve ser feito o cadastramento do projeto no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) do Ministério do Meio Ambiente ou no Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na Plataforma Carlos Chagas.

O Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) ampliou o credenciamento do CNPq para emitir autorizações de acesso para pesquisa, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico, mas ainda não o permite autorizar atividades que envolvam o conhecimento tradicional associado, que deve ser buscado junto ao Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). As informações são fornecidas exclusivamente por meio eletrônico, dispensando o uso de documentos impressos. Essa descentralização permite agilizar de forma eficiente a obtenção de autorizações de acesso ao patrimônio genético.

A escolha do local e do método a serem utilizados também estão relacionados ao objetivo da coleta, ou seja, o tipo de microalga de interesse a ser isolada e o estudo a ser realizado. Uma vez definido o objetivo e os locais de coleta de amostras, todo o material de laboratório utilizado na sua realização deve ser previamente higienizado por meio de lavagens e esterilização em autoclaves ou estufas, agentes químicos e radiação ultravioleta, conforme descrito por Lourenço (2006). Em cada local de coleta, devem ser determinados os dados de georreferenciamento, os valores de alguns parâmetros da água, tais como: profundidade de amostragem, pH, temperatura, condutividade e teor de oxigênio dissolvido, caso existam aparelhos de campo devidamente calibrados. Os dados de coleta precisam ser registrados na caderneta de campo, incluindo data, local, coletor e outras indicações consideradas relevantes para a codificação e identificação das estirpes isoladas. Esses procedimentos são importantes para a escolha dos meios de cultivo a serem utilizados no processo de isolamento, pois os espécimes podem apresentar diferentes requerimentos nutricionais, assim como a necessidade de enriquecimento adicional (carboidratos, vitaminas, etc.) do meio, para que ocorra um bom desenvolvimento celular mesmo fora do seu ambiente natural.

Para a coleta de amostra em lagoas, podem ser utilizados recipientes simples, como garrafas de volume variável. Con-

tudo, a coleta em ambientes aquáticos com maior profundidade precisa ser realizada com o auxílio de coletores especiais, como a rede de plâncton, com 20-30 μm de malha, para microplâncton e a garrafa oceanográfica, para nanoplâncton e picoplâncton. O processo consiste em inverter a rede e recolher para uma taça. Dividir a amostra obtida em dois frascos de coleta, colocando aproximadamente 1 mL em frasco com meio de cultura. Uma das subamostras deve ser fixada, normalmente com formaldeído a 5%, e a outra mantida fresca, em caixa térmica para serem analisadas o mais rápido possível. Etiquetar convenientemente cada amostra diretamente no frasco ou etiquetas com lápis. Nas coletas específicas para obtenção de microalgas filamentosas, deve-se recolher o material com uma colher ou coador e proceder como descrito anteriormente.

Após a coleta, as microalgas podem ser mantidas *in vitro*, em condições de multiplicação para a realização de estudos relacionados à sua fisiologia ou serem imediatamente submetidas à fixação com conservantes químicos, para estudos morfológicos, catalogação e diversidade, que não exijam a viabilidade das células. Como a retirada do microrganismo do seu ambiente original é estressante para a célula, imediatamente após a chegada do material ao laboratório deve-se iniciar o processamento da amostra. Caso seja necessário esperar mais de 24 horas entre a coleta e o processamento, o pH das amostras deve ser verificado e estas mantidas em câmara de crescimento ou, ainda, refrigeradas a baixas temperaturas e irradiância de luz.

2.3.2 Isolamento e inoculação/repicagem de células unialgais

Com o material biológico coletado já no laboratório, o isolamento é iniciado pela filtragem das amostras em papel-filtro, para retirada de fragmentos maiores, de macrorganismos e microrganismos que não são de interesse. Contudo, algumas

amostras podem conter fragmentos onde as algas de interesse podem estar incrustadas. Nesse caso, antes da filtração pode ser utilizado ultrassom de baixa intensidade, pois além de remover células aderidas em superfícies, o sonicador também propicia separação ou fragmentação de colônias, facilitando o isolamento das células. A centrifugação, geralmente, no máximo a 2.000 rpm por 1-3 min tem sido empregada para separar as células de tamanho menor, que ficam no sobrenadante, das células com tamanho superior a 9 μm , que se depositam no fundo do tubo. Esse procedimento pode ser utilizado como um pré-tratamento das amostras biológicas para os vários métodos de isolamentos, tais como: diluição celular sucessiva, diluição seriada e isolamento em meio sólido, descritos a seguir.

O enriquecimento da amostra coletada ou mesmo a transferência para meios de cultivo com menor concentração de nutrientes é um passo preliminar para isolamento de células de microalgas. O enriquecimento da amostra consiste na adição de extrato de solo, de meio de cultivo e de macronutrientes como nitrato, amônia, fosfato e outros. Meios de cultivo com poucos nutrientes podem ser obtidos por meio da diluição de meios usuais já preparados ou diretamente pela redução quantitativa dos reagentes no protocolo de preparação do meio.

A inoculação consiste em espalhar uma gota de água, contendo diversas microalgas, sobre uma camada de meio de cultivo solidificado com ágar em placas de Petri esterilizadas. As placas de Petri inoculadas, quando incubadas em câmara climatizada com condições adequadas de luz, temperatura e umidade, permitem o desenvolvimento das microalgas. A escolha entre as metodologias de isolamento dependerá diretamente do objetivo de trabalho e das condições de infraestrutura em equipamentos, vidrarias e reagentes de cada laboratório e, especialmente, da mão de obra disponível. Os procedimentos de isolamento da microalga de interesse podem ser realizados de maneira tradicional, utilizando lupa ou microscópio invertido

ou, se disponível, equipamentos automatizados. Existem diversos métodos e/ou combinações desses procedimentos para o isolamento de microalgas em laboratório e todos apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Procedimentos metodológicos de isolamento de células de microalgas de uso comum em laboratório a partir de amostras de água, solo, tecido vegetal com as respectivas vantagens e desvantagens.

Métodos de isolamento	Indicação	Vantagens	Desvantagens
Diluição aleatória	Células com mais de 10 μm	Facilidade na realização	Sem especificidade da diluição e concentração, não obtém cultura axênica
Diluição sucessiva seriada	Todos os tamanhos de células	A diluição permite estimar a concentração celular e calcular quantas diluições são necessárias para isolar uma única célula	Grande quantidade de material utilizado, não obtém cultura axênica
Estriamento na superfície do meio sólido	Células muito pequenas	Facilidade de visualização de contaminantes	Não indicado para células flageladas. Possibilidade de contaminações externas.
Isolamento da gota ou borrifo no meio sólido	Todos os tamanhos de células	Facilidade na realização e baixo custo	Inespecífica

Continua.

Tabela 2.3. Continuação.

Métodos de isolamento	Indicação	Vantagens	Desvantagens
Inoculação dentro do ágar	Restrito às espécies tolerantes à exposição temporária a altas temperaturas. Representantes do picoplâncton são robustas e de crescimento rápido.	Manter a microalga isolada nessas condições por tempo indeterminado	Mão de obra especializada em microscopia
Fototaxia	Flagelados com forte capacidade natatória e resposta à luz	Obtenção de clones após concentração de células, diluição em série e isolamento em meio sólido	Não garante separação total das espécies
Pesca com micropipetas diretamente sob microscópio/lupa	Células maiores do que 10 μm	Células individuais	Mão de obra especializada em microscopia
Micropipetagem acoplada a tubo de silicone	Células menores do que 10 μm	Células individuais	Microscópio invertido
Citometria de fluxo	Tamanho de células de 0,2 μm a 200 μm e com densidade celular inferior a 1.000 células mL^{-1}	Facilidade na realização para obter culturas clonais axênicas. Permite a quantificação de células do nanoplâncton e picoplâncton.	Alto custo do equipamento e necessidade de mão de obra especializada

Fonte: Baseada em Lourenço (2006).

Após a coleta e preparo das amostras, são realizadas as diluições seriadas, buscando-se obter células unialgais. Os métodos de diluição podem ser utilizados para o isolamento de células, de acordo com o tamanho da célula microalgal de interesse. O método chamado de diluição sucessiva é empregado para microalgas com tamanho superior a 10 μm e requer a visualização por meio de microscópio estereoscópico. Consiste na aspiração de pequena porção de meio que contenha a célula de interesse, com o auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, a alíquota é transferida sucessivamente para gotas de meio líquido dispostas em lâminas escavadas ou placa de Petri, até que seja transferida apenas uma célula de microalga. Esta célula é, então, transferida para meio de cultivo diluído e o cultivo é submetido a condições ideais de crescimento para que ocorra sua replicação. Nesse método, a diluição não precisa ser realizada em gotas de mesmo volume, uma vez que o objetivo é a separação de uma célula e não a estimativa de concentração celular no cultivo. Essa técnica de diluição também pode ser realizada em microplacas, geralmente de 96 poços, sob microscópio ótico invertido, o que possibilita o isolamento de células com tamanho inferior a 10 μm . Nesse caso, a sucção da célula é realizada com o auxílio de uma mangueira de silicone adaptada em uma pipeta.

O método de diluição seriada decimal pode ser utilizado para todos os tamanhos de células de microalgas, desde que o cultivo esteja com grande número de células, no geral, acima de 10^5 UFC mL^{-1} . O procedimento consiste na transferência seriada de 1 mL do cultivo para tubos contendo 9 mL de água ou meio de cultivo. A contagem das células é realizada e com base nisso é possível calcular quantas transferências serão necessárias até a obtenção de uma única célula por tubo, uma vez que a cada transferência ocorre a diluição de 10 vezes. Por garantia, é melhor que sejam separados vários tubos que contenham, teoricamente, uma célula. Estes devem ser incubados em condições de temperatura, luminosidade e agitação ideais de desenvolvimento. Na Figura 2.1 é apresentado o fluxograma para isolamento de microalgas, resumindo as etapas dos proce-

dimentos de coleta, preparo das amostras e isolamento de colônias de microalgas em meio de cultura solidificado com ágar e inoculação pelo método de diluição seriada decimal.

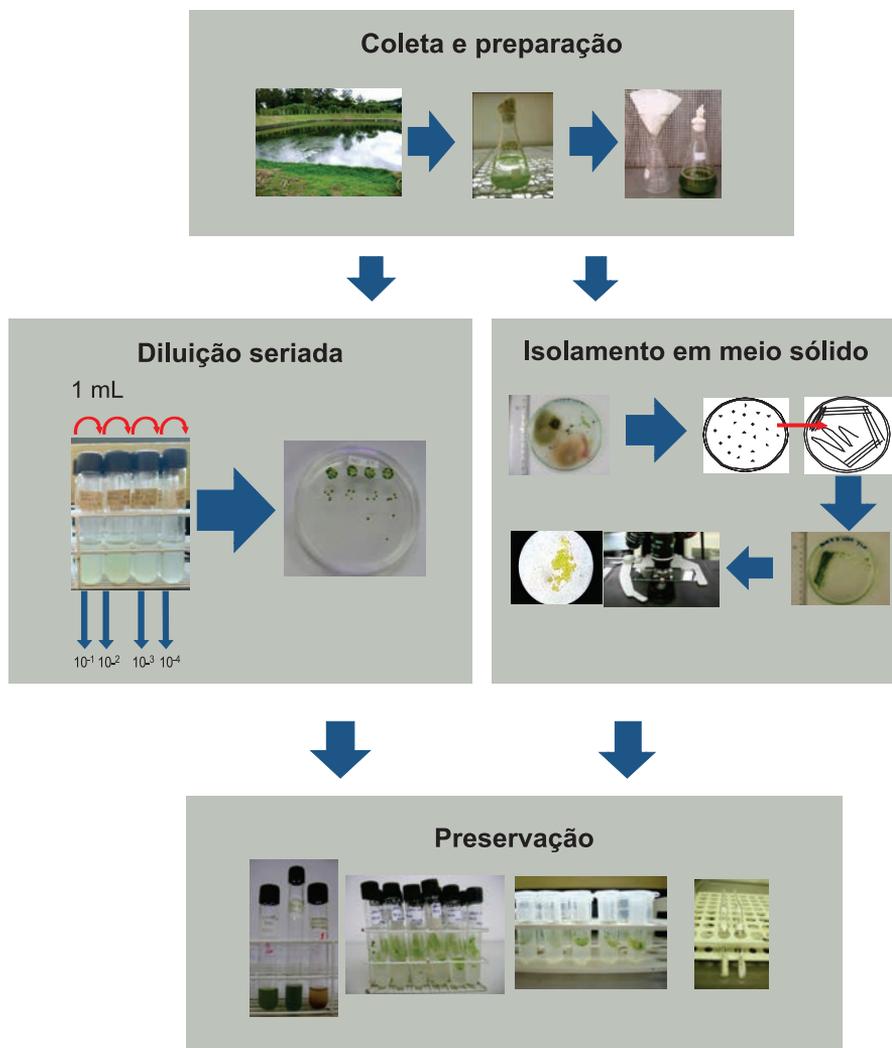


Figura 2.1. Fluxograma das etapas do processo de coleta, preparo das amostras e isolamento de colônias de microalgas em meio de cultura solidificado com ágar e inoculação pelo método de diluição seriada.

A técnica do isolamento em meio sólido costuma ser empregada para obter microalgas pertencentes ao nanoplâncton e fitoplâncton, que devido ao tamanho reduzido dificulta a manipulação em meio líquido. Porém, esse procedimento metodológico não é indicado para o isolamento de espécimes flagelados, que apresentam grande dificuldade de desenvolvimento em meio sólido. Nessa técnica, alíquotas da amostra filtrada são utilizadas para a inoculação em diferentes meios de cultivo solidificados com ágar que podem ser simples, diluídos ou enriquecidos. Com o auxílio da alça de platina, alíquotas da amostra filtrada são coletadas e espalhadas sobre o meio de cultivo, pelo método de esgotamento, em várias placas de Petri, visando obter colônias isoladas. Os cultivos em placa de Petri são, então, incubados em condições ideais de crescimento até o aparecimento de colônias isoladas. Os espécimes obtidos são, então, mantidos em dois tubos contendo meios de cultura, sendo um sólido e o outro líquido, adequados para a posterior caracterização e depósito na coleção de microalgas.

No isolamento em meio de cultura sólido, outra medida que pode ser utilizada para seleção das microalgas de interesse é a adição de antibióticos ao meio de cultivo, visando diminuir a contaminação por bactérias e fungos. Contudo, essa medida só deve ser tomada após os primeiros repiques, quando o cultivo já está estabelecido.

Para obter microalgas com determinadas características, como alto teor de lipídeos na biomassa, por exemplo, metodologias específicas de isolamento têm sido descritas. A citometria de fluxo é uma técnica automatizada que consiste na contagem e análise de propriedades ópticas das células suspensas no cultivo. No citômetro de fluxo são realizadas múltiplas e simultâneas medições em alta velocidade baseadas na medição do espalhamento de luz e na fluorescência individual das células de uma população em suspensão. No final da análise é possível separar visual ou fisicamente grupos de microrganismos distintos, com

base no seu tamanho e fluorescência. É possível mensurar células de 0,2 μm a 200 μm . Apesar de ser a metodologia mais prática para quantificação de células, também é a menos acessível, devido ao alto custo do equipamento, além de requerer mão de obra especializada para a sua complexa manipulação.

A citometria de fluxo, juntamente com fluorescência ativada, tem sido considerada uma metodologia eficiente para separar células para o isolamento de microalgas. A metodologia de fluorescência ativa de separação de células (FASC) é um procedimento mais rápido do que a maioria dos métodos comuns para o isolamento de microalgas, com a vantagem de ser capaz de obter culturas axênicas de microalgas em semanas. Pereira e colaboradores (2011) descrevem o procedimento desse novo método FASC por coloração de fluorescência para obter células ativadas a partir de uma amostra ambiental, visando à seleção em microplacas e o isolamento de microalgas ricas em lipídeos. Os resultados mostraram que a classificação direta em meio sólido mediante FASC pode reduzir o tempo em cerca de três semanas, durante o processo de aumento de escala, em comparação com o crescimento das mesmas culturas em meio líquido. Os autores ainda relataram que essa abordagem permitiu isolar uma coleção de microalgas de diferentes filos de culturas axênicas.

2.3.3 Codificação das estirpes numa Coleção *ex situ*

Na coleção de microrganismos, todo material depositado deve ser acompanhado de informações sobre sua procedência, local de coleta e identificação de cada um de seus espécimes ou de suas partes (BRASIL, 2002; WFCC, 2010). A manutenção de registros apropriados para cada espécimen é essencial para o funcionamento de coleções *ex situ* de trabalho e de serviço, mantidas em subcultivo ou criopreservadas, bem como nos cultivos fixados (herbários). Isso porque a troca ou perda de informação resultará em perda do material biológico. Existem dife-

rentes métodos possíveis para a manutenção de registros de material armazenado e a escolha do procedimento a ser estabelecido deve considerar as classes principais de informação, a metodologia de preservação utilizada, a localização e identificação do material armazenado, a data de preservação, etc.

O Código Padrão de Pré-Analíticas (CPPA) foi desenvolvido pelo setor de biobancos da área clínica/médica para facilitar a rastreabilidade nos processos pré-analíticos de espécies entre diferentes biobancos e permitir a interconectividade e interoperacionalização desses consórcios. O CPPA clínico consiste em informações de opções padrão pré-analíticas variáveis (sete códigos), que compreendem as metodologias publicadas e, preferencialmente, validadas. Embora projetado para facilitar a investigação clínica, o conceito poderia ter utilidade em coleções de culturas que servem as comunidades ambientais e de biodiversidade. Benson e colaboradores (2011) reportam um estudo de caso da adaptação do CPPA da medicina/clínica para coleções de culturas de microalgas e os procedimentos de criopreservação. O código CCPA adaptado por Benson e colaboradores (2011) é construído com base em procedimentos desenvolvidos pela Algoteca de Coimbra (ACOI), Universidade de Coimbra, Portugal, e métodos da coleção utilizados para acesso remoto das amostras.

Brevemente, pode-se resumir os sete códigos assim:

1. Descreve o tipo de amostra, por exemplo, bentônica, simbiote ou pelo ambiente ou categoria do habitat, por exemplo, urbano, intertidal;
2. Refere-se ao método de coleta do material biológico;
3. Refere-se ao recipiente de coleta;
4. Descreve as condições de transporte a partir do local de coleta no campo e os procedimentos operacionais utilizados para estabilizar as amostras durante o período em que são transferidas do campo para a realização da primeira estocagem no laboratório ou facilidades para coletas distantes ou para o biobanco no caso de amostragem local;

5. Relatórios do tempo de transporte da amostra, variando a partir de coletas em locais próximos à Coleção (1-2 dias) para expedições distantes;
6. Refere-se ao isolamento da microalga e à iniciação da cultura;
7. Descreve os procedimentos opcionais de cultivo para as práticas axênicas e não axênicas.

A codificação inicia-se com a rotulagem correta dos frascos utilizando canetas indelévels ou lápis. As informações do rótulo devem incluir um código de identificação e o número do lote igual ao presente na ficha de registro da estirpe isolada. Esses registros devem ser mantidos, preferencialmente, em cadernos com folhas numeradas, contendo informações do local de coleta, município, coordenadas geográficas (latitude e longitude).

A Coleção IPR de Microalgas adota a codificação em que cada estirpe de microalga recebe um número precedido do *acronomin* (sigla) IPR. Quando as estirpes são identificadas ao nível de gênero ou espécie, após a sigla IPR adicionam-se as duas/três letras, sendo as duas primeiras referentes às letras iniciais do gênero e a terceira, quando identificada, a letra inicial da espécie, e a numeração arábica sequencial. Por exemplo, IPRChs7107 refere-se à *Chlorella sorokiniana*.

Para material em condições de congelamento, precisa existir ainda mapa com o código de localização para cada frasco dentro da unidade conservadora. As duplicatas dos registros de estoques devem ser mantidas em local separado, a partir dos registros de trabalho. O código localizador deve ser específico o suficiente para permitir a recuperação rápida e fácil de um determinado lote. Da mesma forma, deve incluir o número da unidade congeladora, um código para a prateleira ou *rack* no congelador, um número para o recipiente (caixa) e um número para a canaleta na caixa. Os códigos detalha-

dos minimizam o tempo de localização do material dentro da unidade congeladora, o que diminui o risco de aquecimento de outros materiais armazenados e a exposição do pessoal de laboratório ao frio extremo.

2.3.4 Caracterização das estirpes e identificação das espécies

A classificação taxonômica das algas, assim como as plantas superiores, segue as regras do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, no qual cada organismo é considerado como pertencente a um certo número de grupos (taxa), de categorias hierarquicamente subordinadas e das quais a espécie constitui a categoria básica (GUIMARÃES, et al. 2009). O nome científico da espécie é uma combinação de dois nomes latinos, o primeiro é o gênero, categoria imediatamente superior, seguido pelo epíteto específico, a espécie. O nome do autor que descreveu a espécie deve ser colocado imediatamente a seguir. A identificação consiste no reconhecimento de que o organismo possui características idênticas as do organismo-tipo da espécie já descrita.

A observação das características celulares com o auxílio de microscópio ótico e o uso de chave de identificação taxonômica (BICUDO; MENEZES, 2006; GUIMARÃES et al., 2009) são de importância fundamental para a identificação do isolado microalgal. Nas últimas décadas, os avanços nas metodologias moleculares têm permitido identificar e caracterizar estirpes de microalgas com base não apenas nas características morfo-fisiológicas, mas também nas genéticas.

2.3.5 Manutenção das estirpes de microalgas em cultivo

No laboratório, a manutenção da coleção exige uma área especial para manter a coleção com temperatura e luminosidade controladas. Os mesmos meios de cultura são utilizados para isolamento e caracterização das estirpes de microalgas.

As estirpes da Coleção IPR de Microalgas são mantidas em cultivo utilizando tubos de rosca contendo os meios de cultura BG-11 (*blue-green medium*) para estirpes cianófitas (ALLEN, 1968; ALLEN et al., 1968; RIPPKA, 1988) e BBM (*bold basal medium*) para estirpes do grupo das clorófitas (NICHOLS, 1973). Os cultivos de microalgas são mantidos em condições de luminosidade e temperatura subótimas (20°C e $< 40 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A repicagem de manutenção é realizada a cada quatro ou seis meses, dependendo do desenvolvimento de cada estirpe, e os tubos são mantidos em câmara biológica com lâmpadas de 20 W e fotoperíodo de 12 h (Figura 2.2).



Figura 2.2. Câmara biológica na qual são mantidos os tubos contendo as estirpes da Coleção IPR de Microalgas.

2.4 Obtenção de Cultivos Unialgais

A obtenção de cultivos axênicos de microalgas é importante para estudos bioquímicos, fisiológicos e genéticos. Métodos para alcançar essas metas incluem as condições axênicas e a obtenção de estirpes unialgais. A manutenção na forma axênica é trabalhosa e por isso nem todas as coleções optam por manter as estirpes completamente livres de outros microrganismos.

Processos como a inoculação em placas com meio de cultivo sólido e centrifugação e diluição, descritas para o isolamento, podem ajudar no processo de purificação dos cultivos. Entretanto, nem sempre essas técnicas são suficientes, sendo necessária a adoção de métodos adicionais como a filtração, a aplicação de radiação ultravioleta (UV), a utilização do gradiente de centrifugação para separar células e o emprego de antibióticos.

A contaminação com bactérias e/ou fungos pode ocorrer em microalgas mantidas em coleções *in vivo*. As camadas de polissacarídeos de células de microalgas desempenham papel importante na estimulação do crescimento bacteriano e uma hipótese é que as enzimas bacterianas são capazes de hidrolisar os polímeros da camada de mucilagem de células de algas, que constituem uma fonte nutricional adicional para o crescimento bacteriano. Park e colaboradores (2008) relataram que uma cultura de *Chlorella ellipsoidea*, mantida em longo prazo no laboratório, apresentou contaminação com pelo menos oito estirpes de bactérias. Os autores descreveram que a coinoculação de cada uma dessas estirpes com *C. ellipsoidea* resultou em 0,5-3,0 vezes maior crescimento do que a *C. ellipsoidea* sozinha. A bactéria mais eficaz em promover o crescimento da *C. ellipsoidea* foi caracterizada pela análise do sequenciamento do rRNA 16S e identificada como do gênero *Brevundimonas*. Nas coculturas houve aumentos na taxa de crescimento da *C. ellipsoidea* e da estirpe bacteriana de *Brevundimonas*, o que implica que a relação entre esses dois microrganismos é simbiótica.

Diversas estratégias têm sido adotadas para a purificação de estirpes de microalgas, incluindo as seguintes etapas (GUILLARD, 2005; PRASAD et al., 2013): seleção seletiva por tamanho e filtração; lavagem das células e centrifugação diferencial; diluição serial; tratamento químico; sonificação e vórtex; micromanipulação; e, plaqueamento em meio solidificado com ágar.

Para purificar culturas de microalgas contaminadas, o método de filtração associado ao uso de lavagem das células com soluções de antibióticos também pode ser utilizado. O importante é saber combinar os diferentes métodos de purificação de cultivos contaminados de microalgas para obter o melhor resultado em menor período de tempo.

2.4.1 Lavagem de células e centrifugação

A centrifugação é um método físico para purificar culturas de microalgas, que consiste em submeter o cultivo a ciclos sequenciais e à transferência sucessiva em meio estéril líquido. O princípio básico é separar outros microrganismos contaminantes como, por exemplo, bactérias, fungos ou outras microalgas por meio da diferença de densidade entre os organismos. O procedimento tem o inconveniente de ter que ser ajustado para cada espécie e deve ser repetido de 10 a 12 vezes. Além da lavagem com água ultrapura estéril, outro procedimento para cianobactérias é adicionar as células concentradas por centrifugação, realizar uma nova lavagem com a adição de uma solução de extran 0,05% seguida de homogeneização, centrifugação a $2,370 \times g$ durante 10 min e descarte do sobrenadante. Esse procedimento deve ser repetido duas vezes com solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM pH 8,0 e etanol 50%) a $4650 \times g$ e uma vez com solução salina 0,85% a $9.000 \times g$. Ao final do processo, as células depositadas no fundo devem ser transferidas com pipetas para meios de cultura, para crescimento. Após o crescimento, a verificação de contaminação deve ser realizada com o auxílio de microscópio e/ou crescimento em meio sólido; caso necessário, deve-se repetir o procedimento. As células lavadas e concentradas podem ser armazenadas a -20°C até a extração de DNA para os estudos de caracterização genética. Deve-se trabalhar sempre com material comprovadamente estéril.

2.4.2. Diluição serial do cultivo

Uma alternativa de purificação de um cultivo de microalgas contaminado é a técnica da diluição seriada em meios de cultura específicos para cada grupo e inoculação em meios solidificados com ágar para obter colônias isoladas que são repicadas para outra placa de Petri contendo meio sólido. O processo deve ser repetido até que sejam obtidas colônias limpas, quando o crescimento passa a ser realizado em meio líquido.

A purificação das culturas de microalgas pode ser melhorada pela combinação de métodos físicos (filtração, lavagem de células e centrifugação) e químicos (antibióticos e fungicidas).

2.4.3 Ultrassom/Sonicador

No caso de culturas de microalgas contendo outros microrganismos contaminantes ou microalgas que têm por hábito a adesão em superfícies, o ultrassom também pode ser utilizado como ferramenta auxiliar. A sonicação permite separar ou fragmentar colônias ou células aderidas a outros materiais, se aplicada em baixa intensidade. Esse procedimento não permitirá alcançar culturas puras, todavia, pode remover microrganismos contaminantes aderidos à superfície da parede celular das microalgas.

Cho e colaboradores (2013) utilizaram uma combinação de ultrassons de células ativadas por fluorescência (FACS) e microseleção para isolar culturas axênicas de *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* de águas residuais suína e *Scenedesmus* sp. de uma lagoa aberta. Os autores relataram que o ultrassom dispersou microrganismos ligados às células de microalgas e reduziu a população de bactérias em 70%, e quando seguidos por separação de células produziram 99,5% de estirpes puras de microalgas. A pureza das estirpes obtidas pelo método de microseleção foi comprovada em meios de cultura sólidos e líquidos em diferentes estados tróficos. Também a ausência de

bactérias não-cultiváveis foi confirmada pela análise de Eletroforese Desnaturante (DGGE) do gene 16S rRNA, enquanto a ausência de contaminantes foi confirmada por meio de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

2.4.4 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) também pode ser utilizada para descontaminação bacteriana e virótica, já que as microalgas são mais resistentes a este agente do que esses microrganismos. O cultivo deve ser acondicionado em frasco aberto, em câmara asséptica, em profundidade não superior a dois centímetros. O tempo de exposição pode variar de 1 a 30 minutos, dependendo da lâmpada utilizada, mas a distância deve ser de pelo menos 25 cm entre a lâmpada UV e o cultivo (LOURENÇO, 2006). A radiação UV tem efeitos deletérios no DNA dos microrganismos, inativando rotas metabólicas importantes. A eficiência da ação germicida do UV nas culturas de microalgas pode ser confirmada por testes em meios de cultura líquidos e sólidos, e utilizando técnicas moleculares com oligonucleotídeos específicos.

2.4.5 Filtração ou difusão em meio de cultura sólido

A filtração é um método capaz de separar microrganismos contaminantes do cultivo algal com base na diferença de tamanho entre as células. Podem ser utilizadas membranas de diferentes materiais e diferentes tamanhos de poros. Para eliminar bactérias e leveduras do cultivo, após a filtração o material algal retido no filtro deve ser assepticamente coletado e inoculado em novo meio de cultivo. No caso de contaminação fúngica, o material a ser coletado e inoculado é o filtrado. Também é possível separar diferentes algas presentes em um mesmo cultivo. Para isolar e separar duas microalgas,

Chlamydomonas sp. de *Chlorella* sp., um método simples de difusão em ágar, com exposição de luz de 6.000 lux durante 7 h, foi desenvolvido por Banerjee e colaboradores (2012). Os autores levantaram a hipótese de que a presença de flagelos e do pigmento rodopsina na *Chlamydomonas* aumentou a atração para a luz e, com isso, a maior fototaxia dessa espécie.

2.4.6 Antibióticos

Embora os antibióticos sejam comumente utilizados para eliminar procariontes das culturas eucariontes (CHU et al., 2004) ou para a obtenção de culturas axênicas de cianobactérias como, por exemplo, *Arthrospira/Spirulina platensis* (CHOI et al., 2008), esses compostos podem ser prejudiciais para algumas estirpes de microalgas. Dessa forma, os antibióticos devem ser utilizados com cautela em cultivos de microalgas, pois causam danos tanto nos microrganismos contaminantes como na própria microalga. A investigação a respeito da sensibilidade das estirpes de microalgas a esses agentes também é importante para a sua utilização em caso de necessidade de descontaminação, sem que ocorram danos para a célula. Os antibióticos devem ser escolhidos de acordo com as espécies cultivadas e o tratamento deve ser de curta duração. Como mais de uma espécie de bactéria ou de fungo pode estar presente no cultivo, é preciso utilizar uma mistura de antibióticos ou incubação sequencial até a obtenção da pureza do cultivo de microalga (LOURENÇO, 2006).

Entre os antibióticos utilizados em associação e/ou em incubação sequencial, podemos citar os bactericidas: penicilina, gentamicina, canamicina estreptomomicina, cloranfenicol, neomicina e os fungicidas ciclohexamida, anfotericina B e nistatina. A avaliação da pureza dos cultivos após a utilização das técnicas pode ser feita por meio da observação por microscopia óptica ou eletrônica, por citometria de fluxo ou, ainda, por teste de crescimento de contaminantes em meios de cultivo.

A manutenção da coleção de microalgas em cultivo requer tempo e observação constante. A visualização de contaminantes nos tubos de preservação implica na repicagem do cultivo em placas contendo meio de cultura específico e recuperação da célula algal original. Em casos de grande contaminação do isolado microalgal, quando não é possível a recuperação do cultivo pela obtenção de uma colônia isolada em placa, outras metodologias envolvendo antimicrobianos devem ser empregadas. Nesse caso, células dos cultivos são concentradas por meio de centrifugação e lavadas cerca de três vezes com solução salina esterilizada. Em seguida, essas células são ressuspensas em meio de cultura específico (BG-11 ou BBM) contendo nutrientes e incubadas por 48 h sob condições subótimas de cultivo: baixa luminosidade ($< 40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$), temperatura ($< 20^\circ\text{C}$) e um fotoper\u00edodo mais curto do que a luz do dia. Esse tipo de regime maximiza o intervalo entre as subculturas e, portanto, minimiza a manipula\u00e7\u00e3o e transfer\u00eancias. As c\u00e9lulas s\u00e3o novamente lavadas e inoculadas em placas contendo meio s\u00f3lido para verifica\u00e7\u00e3o da pureza do cultivo. Ap\u00f3s o crescimento, col\u00f4nias isoladas s\u00e3o transferidas, em triplicata, para tubos contendo no m\u00ednimo cinco mililitros de meio de cultura est\u00e9ril e espec\u00edficos para cada grupo (DAY; BENSON; FLECK, 1999).

Contudo, na maioria das vezes, o uso de um \u00fanico antimicrobiano n\u00e3o \u00e9 suficiente para descontaminar e se obter col\u00f4nias isoladas de microalgas. S\u00e3o necess\u00e1rias incuba\u00e7\u00f5es em s\u00e9rie em diferentes subst\u00e2ncias antimicrobianas e, consequentemente, sucessivas repicagens em placas com meio de cultivo espec\u00edfico. Assim, como o tempo de visualiza\u00e7\u00e3o de col\u00f4nias em meio s\u00f3lido \u00e9, em m\u00e9dia, de seis dias, a descontamina\u00e7\u00e3o de uma \u00fanica estirpe pode durar semanas. Jones e colaboradores (1973) relataram que para eliminar levedura de uma cultura de *Chlorella vulgaris* Beij. var. *vulgaris* foi necess\u00e1ria a adi\u00e7\u00e3o de neomicina, ceporin ou estreptomomicina, al\u00e9m da mistura de quatro antibi\u00f3ticos: penicilina, tetraciclina, clorafenicol e aureomicina.

Santos e Azanza (2011) relataram que quando foi aplicada uma mistura composta dos antibióticos ciprofloxacina, canamicina, neomicina e estreptomicina, em combinação com uma etapa de filtração, o crescimento da bactéria associada a um dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* MZRVA foi inibido completamente. Todavia, os autores sugeriram que, em alguns casos, a população de bactérias associadas ajudam o crescimento de *P. bahamense* em cultivo *ex situ* e, provavelmente, na natureza.

2.5 Manutenção das Culturas Unialgais em Subcultivo

Um número grande de trabalhos tem enfatizado a importância das microalgas mantidas em subcultivo periódico em coleções que servem como fonte de recursos biológicos fundamental para diversos estudos biotecnológicos que demandam a viabilidade das células (CHO et al., 1999; MARGALITH, 1999; METZGER et al., 2005; DAY; STACEY, 2008; GUSTAVS et al., 2010; ÖRDÖG et al., 2012). Esse tipo de coleção também serve de suporte para estudos de ecofisiologia, diversidade e taxonomia, além ser uma fonte de estirpes para alimentação em aquicultura e também para bioensaios com metais pesados, entre outros (DAY; BENSON; FLECK, 1999; FERNÁNDEZ-SEVILLA et al., 2010).

A forma tradicional e mais comum de manutenção das microalgas tem sido a de subcultivo periódico em meio de cultura líquido mantido em condições subótimas de temperatura e luminosidade (DAY et al., 1997; LOURENÇO, 2006). A frequência de renovação de cultivos deve ser determinada pelas características de crescimento de cada estirpe, uma vez que cada uma delas apresenta diferenças na duração de cada fase de desenvolvimento. Geralmente, a transferência do inóculo ocorre no final da fase logarítmica de crescimento ou no início da fase estacionária, e consiste na transferência de pequena alí-

quota dos cultivos para um novo de meio de cultivo (LORENZ, FRIEDL; DAY, 2005). Esse método comum e tradicional de preservação de microalgas consiste em repicagens sucessivas das culturas em estágio exponencial tardio para meio de cultivo líquido e/ou sólido.

No entanto, a manutenção de coleções em subcultivo periódico, durante longos períodos de tempo, é laboriosa e demanda manutenção constante, com intervalos de repicagem não superiores a seis meses, sendo relativamente complexa, demorada, dispendiosa e exigente de mão de obra especializada (LORENZ, FRIEDL e DAY, 2005). Também existem questionamentos em relação à manipulação contínua de células metabolicamente ativas, uma vez que podem sofrer alterações genéticas, conforme ocorre com microrganismos patogênicos, que após sucessivas repicagens podem perder genes relacionados à patogenicidade (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; GUIMARÃES; AMARAL; SANTOS et al., 2009).

2.6 Preservação das Culturas Unialgais Viáveis

O Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Código de Viena) aceita culturas-tipo de fungos e algas, desde que sejam preservadas em estado metabolicamente inativo. Day e colaboradores (2010) descrevem um procedimento para o tipo de criopreservação de culturas em ultrabaixas temperaturas (inferior a -135°C), garantindo que o material seja mantido em estado estável, metabolicamente inativo. Esse procedimento permite o acesso direto à estirpe-tipo, facilitando os diversos estudos taxonômicos, incluindo as técnicas moleculares de análises de genômica, metabolômica e proteômica.

A necessidade de preservação *ex situ* de novas espécies descritas tem levado à formação de coleções com culturas unialgais de microalgas. No entanto, a falta de mão de obra (especialmente após encerrar os estudos), custos elevados de manutenção

e métodos de preservação inadequados, muitas vezes, resultam na perda de materiais de pesquisa e um desperdício de esforço para realizar reisolamentos de espécies de microalgas importantes. Vários parâmetros geralmente são considerados muito importantes em criopreservação, incluindo a escolha do agente crioprotetor, a concentração de crioprotetor, a taxa de congelamento, o estado fisiológico da cultura e os procedimentos de descongelamento. Isso torna muito difícil estabelecer diretrizes universais para a criopreservação de microalgas.

A preservação de cultivos em coleções de microalgas pode ser realizada utilizando-se as células em estado vegetativo ou sob temperaturas baixas e/ou ultrabaixas. Em ambos os casos, as células são mantidas em estado metabólico mais lento, visando aumentar o período entre os subcultivos. Preservantes como o óleo mineral podem ser utilizados para um maior tempo de estocagem em cultivos em meio sólido, à temperatura ambiente. Na Tabela 2.4 são sumarizados alguns métodos de preservação.

O termo criopreservação é utilizado exclusivamente para definir o armazenamento de material biológico vivo em temperaturas ultrabaixas, normalmente na/ou perto da temperatura do nitrogênio líquido (-196°C). Estudos sobre os procedimentos de preservação de microalgas devem fazer parte da rotina de manutenção em uma coleção e a escolha do método de preservação de estirpes deve ser de acordo com as características biológicas de cada espécimen. Um procedimento de criopreservação típico para ser estabelecido em uma coleção pode ser composto pelas seguintes etapas: pré-crescimento; crioproteção química; congelamento com desidratação; armazenamento em nitrogênio líquido; descongelamento rápido; e, a recuperação das células unialgais para verificação da viabilidade.

Para temperaturas abaixo de 0°C , recomendam-se os criopreservantes, substâncias adicionadas ao cultivo celular para prevenir danos celulares causados durante o congelamento e o descongelamento (PUNCOCHAROVA, 1988; HUBÁLEK, 2003; PONCET et al., 2003; ANDERSEN, 2005; DAY; JOHN et al., 2007). Os aditivos crioprotetores utilizados na criopreservação de microrganismos (vírus, bactérias, fungos, algas e protozoá-

rios) incluem uma variedade de compostos químicos simples e mais complexos, mas apenas alguns deles têm sido amplamente utilizados e com resultados satisfatórios: estes incluem dime-tilsulfóxido (Me_2O), glicerol, soro sanguíneo ou da albumina sérica, leite desnatado, peptona, extrato de levedura, sacarose, glicose, metanol, polivinilpirrolidona (PVP), sorbitol e extrato de malte (HUBÁLEK, 2003).

Tabela 2.4. Técnicas para preservação de células de microalgas com as respectivas vantagens e desvantagens.

Técnica de preservação	Vantagens	Desvantagens
Taxa de resfriamento conhecida	Técnica rápida, apresenta estabilidade sem quebras de células. Crioprotetores relativamente não tóxicos. Facilidade na realização.	Requer equipamento específico. Alto custo do equipamento e demanda de mão de obra especializada.
Vitrificação	Não requer equipamento específico, procedimento rápido e rápida recuperação.	Soluções para vitrificação são na maioria tóxicas. Não garante integridade das células. Requer cuidados e tempo para troca da solução.
Encapsulamento/ desidratação	Não requer equipamentos específicos, crioprotetores. Procedimento de descongelamento simples. Rápida recuperação.	Requer manuseio de cada cápsula várias vezes. Algumas espécies não toleram altas concentrações de sacarose.

Fonte: Lepesteur et al. (1993); Day et al. (2007); Zhang et al. (2009); Day et al. (2000); Lourenço (2006); Day et al. (2007).

Substâncias como alcoóis e derivados, sacarídeos e polissacarídeos, amidos e imidas, peptídeos, proteínas e glicoproteínas podem ser utilizadas como criopreservantes isoladamente ou, ainda, em combinação (HUBÁLEK, 2003). Os criopreservantes penetrantes são os que atravessam passivamente a membrana plasmática celular, causando alterações na permeabilidade e também diminuindo a temperatura na qual a água intracelular congela. São representantes desse grupo o metanol (MeOH), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol. Já os criopreservantes não-penetrantes são os que se mantêm no ambiente extracelular e diminuem a quantidade intracelular de água disponível, evitando a formação de gelo, fazendo parte desse grupo a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG) (ANDERSEN et al., 2005; ANDERSEN, 2005; DAY; STACEY, 2008; AMARAL et al., 2009).

Desenvolvimentos recentes na tecnologia de criopreservação têm permitido o armazenamento a longo prazo de muitas estirpes de microalgas, com altas taxas de sobrevivência. No entanto, muitas estirpes ainda não podem ser recuperadas a partir do armazenamento em nitrogênio líquido. As vantagens de criopreservação com nitrogênio líquido foram demonstradas por Nakanishi e colaboradores (2012), que investigaram os efeitos de agentes crioprotetores para *Chlorella vulgaris* (C-27 e M-207A7), e duas microalgas marinhas, *Nannochloropsis oculata* (ST-4) e *Tetraselmis tetrathele* (T-501), cujas células foram suspensas em várias soluções de crioprotetores e lentamente resfriadas a -40°C antes da sua imersão em nitrogênio líquido. Pouco ou nenhum efeito de crioproteção foi observado com o uso do dimetilsulfóxido sozinho ou em combinação com sorbitol ou prolina; com glicerol sozinho, ou com etileno glicol por si só. No entanto, taxas de sobrevivência de aproximadamente 50% foram observadas, utilizando-se uma mistura de crioprotetor de 5% de dimetilsulfóxido, 5% de etileno glicol e 5% de prolina. Da mesma forma, a viabilidade e o teor de clorofila persistiram sem alterações significativas durante um período de armazenamento de 15 anos.

A manutenção de culturas puras de microalgas utilizando métodos de preservação é de grande importância para fins biotecnológicos. No entanto, a preservação não garante necessariamente a estabilidade genética dessas culturas. Rastoll e colaboradores (2013) utilizaram metanol a 5% e dimetilsulfóxido a 3% como agentes crioprotetores e observaram pela técnica de coloração vital das células que mais de 83% das cianobactérias testadas foram passíveis de criopreservação. No entanto, para microalgas marinhas foram observadas diferentes respostas de recuperação da viabilidade das células após criopreservação. Nesse estudo foram testadas taxas de resfriamento, com ou sem crioprotetor (dimetil sulfóxido e metanol), concentrações dos crioprotetores e tempo de exposição das células (CAÑAVATE et al., 1995).

Os procedimentos para determinar o protocolo de pré-congelamento ideal para criopreservação de microalgas têm sido estudados com diversas espécies. Lepesteur e colaboradores (1993) avaliaram, por análises de citometria de fluxo, dez métodos para preservar as populações de fitoplâncton. Tais métodos apresentavam procedimentos diferenciados pela velocidade de congelamento e descongelamento, bem como a utilização, ou não, de crioprotetores (DMSO e/ou glicerol) e fixação química. Esses métodos foram testados em três microalgas de água doce e de espécies de microalgas marinhas, considerando parâmetros de intensidade diferentes e duas propriedades. Em primeiro lugar, a perda de células foi mais significativa com o congelamento rápido e a fixação química, e menos significativa com a adição de agentes crioprotetores.

Dois procedimentos de criopreservação foram aplicados em três espécies de microalgas, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana* e *Dunaliella salina* com resfriamento lento e congelamento rápido e com ou sem crioprotetor (dimetilsulfóxido, Me₂SO a 10% e 15% v/v). As três espécies de algas seguiram o mesmo padrão de recuperação (crescimento) e maior do que o dos controles. O congelamento rápido não foi adequado para a

criopreservação de *I. galbana*, mas deu boa viabilidade pós-descongelamento para *D. salina* (70%) (GUERMAZI et al., 2010).

Na Tabela 2.5 são apresentados os dados de diversos trabalhos testando algumas técnicas com diferentes procedimentos de congelamento utilizados na criopreservação de microalgas, bem como a viabilidade obtida.

Tabela 2.5. Procedimentos de congelamento para criopreservação de diversas espécies de microalgas.

Microalga	Procedimento de congelamento	Tempo e temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
Diversas <i>Chlorophyceae</i>	a) Congelamento rápido e a -196°C. b) Congelamento sem controle entre -10°C e -70°C. c) Congelamento sem controle a -25°C.	Exposição momentânea para a temperatura final.	a) 0-30. b) 0-100. c) 0-82.
<i>Porphyridium cruentum</i>	a) Congelamento rápido a -76°C. b) Congelamento lento a -76°C.	10 a 100 min.	“Alguma” recuperação.
<i>Ankistrodesmus</i> sp.; <i>Chlamydomonas pseudagloe</i> ; <i>Chlorella</i> sp.; <i>Coccomyxa</i> sp.; <i>Euglena</i> sp.; <i>Scenedesmus</i> sp.	a) Resfriamento lento a -30°C, então a -79°C. b) Congelamento rápido sem controle a -79°C. c) Resfriamento lento a -30°C, então a -196°C.	1 a 36 meses a -196°C.	Até 100.

Continua.

Tabela 2.5. Continuação.

Microalga	Procedimento de congelamento	Tempo e temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	a) Resfriamento lento a -40°C, então a -196°C. b) Resfriamento rápido a -25°C, aguardando por 20 min., então a -196°C.	6 a 17 meses a -196°C.	Colônias viáveis recuperadas.
<i>Chlorella</i> sp.; <i>Scenedesmus</i> sp.; <i>Nitzschia</i> sp.; <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Congelamento rápido sem controle, então a -196°C.	24 h a -196°C.	75-90.
<i>Chlorella</i> sp.	Resfriamento lento a -60°C, então a -196°C.	a) Três meses a -196°C. b) Momentâneo.	a) 60-85. b) 0,1- > 90.
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Resfriamento lento a -55°C, então a -196°C.	Exposição a -196°C por 7 dias.	0,003-10.
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	a) Resfriamento lento a -20°C, então a -75°C. b) Resfriamento lento a -180°C, então a -196°C. c) Resfriamento lento a -20°C, -75°C, então a -196°C.	a) 10 dias a 5 semanas a -75°C. b) 10 dias a 4 semanas a -196°C. c) 3 dias a -196°C.	a) 0,01-7. b) 0,05-1. c) 0,01-5.
Diversas <i>Chlorococcales</i>	a) Resfriamento lento entre -8°C e -30°C, então a -196°C.	Até 2 anos a -196°C.	Até 96,7.

Continua.

Tabela 2.5. Continuação.

Microalga	Procedimento de congelamento	Tempo e temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
<i>Euglena gracilis</i>	a) Resfriamento controlado para a faixa entre 0°C e -20°C, então a -196°C.	Não detalhado.	Pelo menos 30.
<i>Nitzschia</i> sp.; <i>Cylindrotheca</i> sp.; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Nannochloris</i> sp.; <i>Dunaliella salina</i>	Resfriamento controlado a -100°C, então a -196°C.	12 meses a -196°C.	Até 87.
<i>Chlorella</i> sp.; <i>Tetraselmis suecica</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Resfriamento lento a -30°C, então a -196°C.	24 h a -196°C.	0,1-0,7.
<i>Chlorella</i> sp.; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Nannochloris</i> sp.; <i>Tetraselmis suecica</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	a) Congelamento rápido não controlado a -196°C. b) Resfriamento lento a -30°C, então a -196°C.	a, b) Exposição breve a -196°C.	a) 0-64,4. b) 0,0-87,1.
<i>Tetraselmis suecica</i>	Resfriamento lento a -30°C, então a -196°C.	24 h a -196°C.	7-74.
a) <i>Tetraselmis chui</i> b) <i>Tetraselmis suecica</i>	Seleção de taxas de resfriamento a -30°C, então a -196°C.	Não detalhado.	a) Até 70. b) Até 40.

Continua.

Tabela 2.5. Continuação.

Microalga	Procedimento de congelamento	Tempo e temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	a) Resfriamento lento -30°C, então rápido resfriamento a -80°C. b) Resfriamento rápido a -80°C.	10 dias a -80°C.	0-60.
<i>Chaetoceros gracilis</i> ; <i>Nannochloris gaditana</i> ; <i>Nannochloropsis atomus</i> ; <i>Rhodomonas baltica</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	Resfriamento controlado a -50°C, então a -196°C.	Exposição breve a -196°C.	0-17.
Espécies de <i>Chlorophyceae</i>	a) Resfriamento a -70°C, então a -196°C. b) Resfriamento a -20°C, então a -70°C e -196°C.	a) 5 dias a -196°C. b) 5 dias a -196°C.	58-100.
<i>Chaetoceros gracilis</i> ; <i>Nannochloris gaditana</i> ; <i>Nannochloropsis atomus</i> ; <i>Rhodomonas baltica</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i> ; <i>Isochrysis galbana</i>	a) Resfriamento controlado na faixa de -51°C e manutenção a -196°C. b) Resfriamento controlado a -50°C, então a -196°C.	3 a 7 semanas a -196°C. 4 a 8 semanas a -196°C.	a) 0,10-95. b) 7-98.

Continua.

Tabela 2.5. Continuação.

Microalga	Procedimento de congelamento	Tempo e temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
a) Microalgas marinhas b) Microalgae de água doce	Encapsulamento /desidratação e manutenção a -196°C.	Vários dias a -196°C.	a) 0-67. b) 0-30.
<i>Chaetoceros gracilis</i> ; <i>Nannochloris gaditana</i> ; <i>Nannochloropsis atomus</i> ; <i>Rhodomonas baltica</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	Resfriamento controlado a -50°C, então a -196°C.	3 a 5 semanas a -196°C.	Até 100.
<i>Chaetoceros</i> sp.; <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	a) Resfriamento a -10°C. b) Congelamento pela imersão em N ₂ líquido e então transferido a -60°C.	7 a 30 dias a -20°C.	Alta sobrevivência após 7 dias.
<i>Chlorella emersonii</i> ; <i>Tetraselmis suecica</i> ; <i>Euglena gracilis</i>	a) Congelamento rápido sem controle a -196°C. b) Congelamento lento a -30°C, então a -196°C. c) Resfriamento lento a -30°C, então, a -196°C.	a, b, c) 1 ano a -196°C.	a) 70. b) 73. c) Crescimento anotado.

Continua.

Tabela 2.5. Continuação.

Microalga	Procedimento de congelamento	Tempo e temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
Extensa seleção de microalgas	a) Resfriamento a -30°C então a -196°C. b) Resfriamento controlado a -30°C, -40°C ou -60°C, então a -196°C.	Armazenamento a “longo prazo” a -196°C.	a) < 10-100%. b) 34-70%.

Fonte: Taylor e Fletcher (1999).

Uma preocupação com o uso de criopreservantes é a possibilidade de causar vários danos ao DNA das espécies reativas ao oxigênio. Alguns dados mostram que os crioprotetores comumente utilizados (dimetilsulfóxido, glicerol, metanol, sacarose e albumina) são eliminadores de hidroxila (OH). Supõe-se que as propriedades antioxidantes dos crioprotetores são essenciais para o seu mecanismo de ação (CHETVERIKOVA, 2012).

2.6.1 Congelamento

A adição de crioprotetores aos cultivos também permite que eles sejam congelados em freezers comuns (-20°C). Testes combinando diferentes metodologias de preservação têm sido realizados, buscando-se maior eficiência da criopreservação.

Outra forma de manutenção de células algais é o congelamento, embora ainda existam dificuldades na manutenção da viabilidade das células devido à formação de flocos de congelamento da água intracelular. Esses focos danificam as organelas no ambiente intracelular e também provocam o rompimento de membranas celulares, levando à morte celular. Para pre-

venir tais danos, substâncias criopreservantes são adicionadas aos cultivos em diferentes concentrações, dependendo da microalga e do tipo de criopreservante. Porém, não existe um método que permita a preservação permanente dos isolados, sendo necessária a verificação da porcentagem de viabilidade das estirpes periodicamente. O percentual de viabilidade das estirpes submetidas ao congelamento pode variar muito, de acordo com a espécie preservada, sendo admitidas recuperações entre 10% e 60%.

2.6.2 Liofilização

O princípio do processo da liofilização (resfriamento a vácuo a -40°C) consiste na manutenção de microrganismos vivos, mantidos em ampolas ou frascos, pela retirada de água das células por meio de vácuo e precedendo ao congelamento por sua sublimação em liofilizador (Figura 2.3).

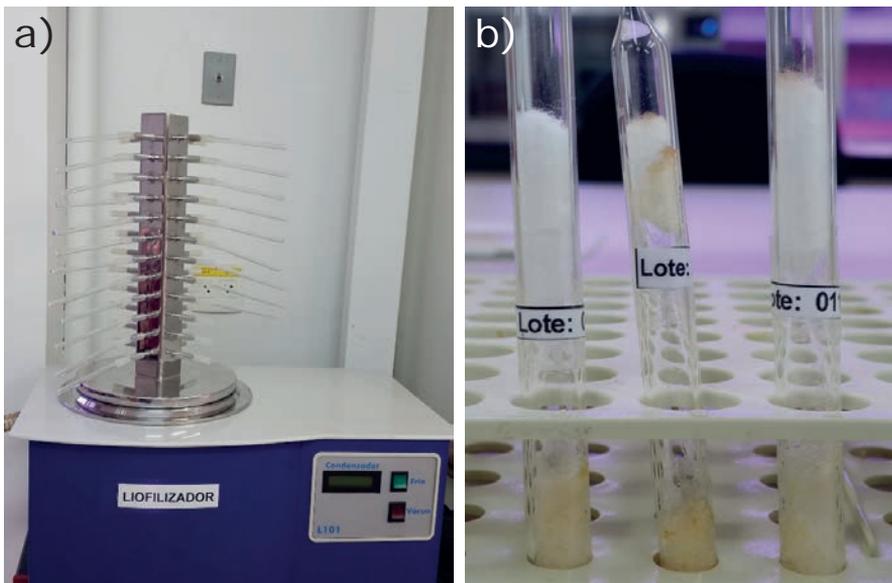


Figura 2.3. a) liofilizador; e, b) ampolas contendo microalgas.

Nessa técnica, as células são protegidas pela adição de agentes crioprotetores, o que possibilita manutenção da sua capacidade de regeneração após o resfriamento. Essa metodologia tem sido bastante utilizada para preservar procariotos e oferece a vantagem de manter por longos períodos a viabilidade celular. O procedimento utilizado no Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR para preservar, principalmente, bactérias diazotróficas é bem simples e foi adaptado para preservar microalgas.

A capacidade de preservar por liofilização estirpes de cianobactérias reduz os custos associados à manutenção de coleções de culturas e reduz os riscos de perda de estirpes-tipo de espécies por meio da contaminação e da alteração genética. Portanto, os métodos de conservação são atualmente necessários para assegurar a viabilidade e a integridade genética, fisiológica e morfológica através de períodos de armazenamento. Esteves-Ferreira e colaboradores (2012) investigaram a viabilidade celular de cinco isolados da coleção de microalgas e cianobactérias do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os autores relataram que a liofilização foi adequada para preservar cianobactérias com heterocistos e outras estirpes que foram capazes de sintetizar espessas camadas de exopolissacarídeos. A liofilização foi também capaz de manter as culturas com níveis baixos de contaminantes. Como crioprotetor, o dimetilsulfóxido foi relativamente eficiente, embora tenham sido observados efeitos citotóxicos em algumas estirpes sensíveis. Os resultados demonstraram que a criopreservação com glicerol é o método mais eficiente.

A viabilidade de células de cianobactérias liofilizadas em soro de carneiro foi avaliada e os dados mostraram a sobrevivência das 13 estirpes (*Anabaena*, *Anacystis*, *Gloecapsa*, *Mensmopedia*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Synechococcus*). Todavia, com exceção da *Nostoc microcorum*, nenhuma sobreviveu quando liofilizada em soro de leite, meio albumina de ovo ou meio de sais de Jansen (CORBETT et al., 1976).

2.6.3 Criopreservação

A criopreservação é uma alternativa a repicagem periódica ou seriada, pois evita trabalho e riscos de perdas de estirpes importantes, entre outros. A criopreservação utilizando nitrogênio líquido tornou-se uma técnica importante para a manutenção em longo prazo de culturas de microalgas, pois evita a alteração genética e reduz o risco de perda ou de contaminação (TAYLOR; FLETCHER, 1999). A criopreservação (-80, -150°C ou -196°C) consiste na manutenção de organismos vivos a temperaturas ultrabaixas, mantendo sua capacidade de regeneração após o resfriamento. Esse processo ocorre em etapas controladas de congelamento e descongelamento, e exige o emprego de crioprotetores e de temperaturas ultrabaixas e/ou nitrogênio líquido (N₂).

No processo de criopreservação, diversos protetores têm sido testados (CAÑAVATE; LUBIAN, 1995; DAY; FLECK; BENSON, 2000; HUBÁLEK, 2003; PONCET; VÉRON, 2003; DAY et al., 2006). A criopreservação é um processo para manter, a longo prazo, o armazenamento por tempo indeterminado de recursos biológicos vivos em temperaturas ultrabaixas. Para melhores resultados na criopreservação, em um trabalho de revisão, Puncocharova (1988) sugeriu o uso de leite desnatado a 10%, adição de glutamato monossódico a 1%, sacarose a 12%, soro de carneiro e cavalo para criopreservação de cianófitas e clorófitas. Embora, universalmente é considerado que o armazenamento criogênico mantém a estabilidade genética e fenotípica dos organismos, ainda existe a possibilidade da criopreservação causar alterações genéticas e, com isso, selecionar subpopulações de microalgas genotipicamente diferentes, devido às lesões causadas por alguns componentes do processo, particularmente por radicais livres de determinados aditivos crioprotetores. A criopreservação de 28 microalgas de águas continentais de diferentes gêneros com protocolo-padrão em duas etapas de resfriamento causou alterações genéticas,

detectadas pela análise de polimorfismo do tamanho de fragmentos cromossômicos em aproximadamente 50% das microalgas (MÜLLER et al., 2007). Os autores discutem a base das alterações induzidas pela criopreservação em termos da sua reversibilidade, se são atribuídas à metilação do DNA e/ou se são verdadeiras mutações que se manifestam no fenótipo; e, sugerem ser mais uma resposta adaptativa ao estresse do congelamento e descongelamento.

Day (2004) reporta que para preservar a viabilidade das células na manutenção de culturas de microalgas, a secagem, o congelamento-seco/liofilização e a criopreservação têm sido utilizados. No entanto, o autor sugere a criopreservação como o método com potencial para garantir a estabilidade de microalgas conservadas em longo prazo. Um dos métodos mais citados na literatura para preservar microalgas viáveis tem sido o de criopreservação com temperaturas e procedimentos variáveis, de acordo com as condições do laboratório e dos grupos taxonômicos (TAYLOR; FLETCHER, 1999; HUBÁLEK, 2003; PONCET; VÉRON, 2003; ACREMAN, 2004; ZHANG et al., 2009).

Na década de 1960, trabalhos pioneiros despertaram um interesse crescente e inúmeras investigações experimentais para a criopreservação de material de microalgas. Majoritariamente, esses estudos referem-se à exigência de preservação a longo termo e de armazenamento de material de algas contidas em coleções de culturas ou utilizados na indústria. Em uma vasta revisão sobre o assunto, Taylor e colaboradores (1999) abordaram diversas técnicas utilizadas na criopreservação de amostras biológicas e sua aplicação tanto para microalgas quanto para as macroalgas. Protocolos de criopreservação empregados por inúmeros pesquisadores são detalhados e observações finais são feitas nessas técnicas e condições, visando assegurar a melhor viabilidade das algas criopreservadas.

Na coleção da *University of Culture Collection of Algae and Cyanobacteria* (UTCC), da Universidade de Toronto, Canadá, é

utilizada a técnica de criopreservação em dois passos, ou seja, resfriamento lento a -1°C por 1 minuto à temperatura de -86°C , e, em seguida, a imersão das células da microalga em nitrogênio líquido. Essa técnica tem sido utilizada com muito sucesso para cianobactérias e microalgas verdes unicelulares (ACREMAN, 2004). Harding e colaboradores (2008) analisaram 14 estirpes representantes de diversas microalgas terrestres eucariontes, que foram criopreservadas pela técnica de encapsulação/desidratação, das quais 12 sobreviveram, apresentando formação de colônias após a recuperação de células da criopreservação. Nessa estratégia crioprotetora, baseada na vitrificação, a sobrevivência variou com o grau de tolerância à desidratação osmótica e à dessecação. O grau de recrescimento das microalgas foi afetado pelo modo de dessecação (gel de sílica ou de fluxo de ar) e pela duração da dessecação por evaporação e exposição à luz durante a fase de recuperação rápida. Os autores demonstraram: a versatilidade do método de encapsulamento/desidratação para criopreservar diversas microalgas; o sucesso da aplicação da tecnologia de criopreservação nas estirpes da Coleção de Cultura de Algas da Universidade de Göttingen (SAG); a recomendação dessa técnica de encapsulamento/desidratação realizada com uma taxa controlada de refrigeração como uma alternativa viável para preservar microalgas em coleções de culturas internacionais.

As grandes coleções de culturas de microalgas (Tabela 2.1) mantêm culturas de algas que consistem em uma população de células/colônias de uma determinada espécie. Em geral, a presença de culturas não-axênicas com outros organismos, tais como bactérias e microfungos, também estão presentes nessas culturas. Estudos indicam que algumas bactérias associadas às culturas são importantes para a absorção de nutrientes das células de microalgas, agindo como simbioses. Apesar desse efeito benigno nas culturas crescendo ativamente, quando a criopreservação é aplicada ao armazenamento em estágios ina-

tivos, esses organismos podem se recuperar mais rápido do que as microalgas, afetando, assim, a sua recuperação e as avaliações de viabilidade.

Para coleções com grande número de estirpes de microalgas a serem preservadas e com espécies sem referência de procedimentos de criopreservação publicados, Amaral e colaboradores (2013) sugeriram uma estratégia para padronizar o processo de criopreservação que vem sendo utilizado na Coleção ACOI. Os autores observaram que parte das células foram perdidas durante o processo de criopreservação devido à adição de crioprotetores (20% a 32% das perdas). Isso ocorre porque o uso desses crioprotetores deve ser combinado com a otimização das metodologias de criopreservação das microalgas.

Amaral e colaboradores (2013) aplicaram testes simples de criopreservação composto de duas etapas em um conjunto de microalgas mucilaginosas e com características celulares conhecidas da Coleção ACOI e avaliaram a viabilidade de amostras descongeladas, bem como a proliferação de microrganismo parceiros. Os autores observaram que as microalgas unicelulares sem estruturas exteriores podem ser criopreservadas com sucesso. Com base nesses resultados, os autores elaboraram um protocolo que consiste da adição de metanol (MeOH) a 5% como um agente crioprotetor e o congelamento rápido das células microalgais. Com a aplicação desse protocolo, pode-se observar a seguintes resultados:

1. Se baixa viabilidade é obtida, cada ponto crítico do método de dois passos é avaliado, começando com um teste de diferentes agentes crioprotetores;
2. Se um melhor resultado é alcançado com um crioprotetor específico, mas a viabilidade ainda é baixa, o próximo passo é substituir o congelamento rápido por congelamento lento;
3. Quando boa viabilidade é alcançada com o protocolo testado, mas a cultura apresenta baixa densidade, al-

terações nas condições de cultivo são consideradas e o protocolo é aplicado a uma cultura densa. Quando a alta viabilidade (> 50%) é alcançada com um dos protocolos testados, então, o armazenamento permanente da microalga torna-se possível.

A criopreservação é um procedimento de manutenção de células de espécimens vivos dos recursos biológicos, em longo prazo, em temperaturas ultrabaixas e com armazenamento por tempo indeterminado. Supõe-se que o armazenamento criogênico mantém a estabilidade genética e fenotípica dos organismos. No entanto, alguns componentes do processo de criopreservação, particularmente alguns aditivos crioprotetores e criolesão mediada por radicais livres, podem causar alterações genéticas nas células. A integridade genética em 28 estirpes de microalgas terrestres criopreservadas foi avaliada utilizando-se a técnica molecular de AFLP, bastante sensível e com altos níveis de reprodutibilidade. Em cerca de metade das estirpes investigadas foram observadas as diferenças genômicas claramente detectáveis após a criopreservação, utilizando-se um protocolo-padrão de duas etapas amplamente utilizado para congelamento. Também foi considerada a possibilidade de que a criopreservação seleciona subpopulações de microalgas genotipicamente diferentes (MÜLLER; DAY; HARDING et al., 2007).

2.6.4 Vitriificação/Encapsulamento

Esse processo consiste na solidificação de um líquido sem cristalização. Esse estado é conseguido em sistemas que se encontram suficientemente concentrados ou que são esfriados rapidamente, para que o aumento em viscosidade iniba o rearranjo molecular em um padrão cristalino. Com o avanço do resfriamento, a viscosidade aumenta até o ponto em que o

movimento de translação molecular é essencialmente parado e a solução torna-se um vidro. Em termos práticos, o vidro é um líquido muito frio ou viscoso para fluir e, embora seja estável no estrito sentido da termodinâmica, é considerado possuidor de estabilidade na escala de tempo de interesse prático para preservação biológica.

A vitrificação consiste no congelamento das células de maneira muito rápida, a $-1.000^{\circ}\text{C min}^{-1}$, seguido da imersão em nitrogênio líquido (DAY; BRAND, 2006). Zhang e colaboradores (2009) aplicaram a técnica de vitrificação/encapsulamento para a criopreservação de microalgas diatomáceas marinhas, verificando variações nos efeitos da composição da solução de vitrificação, a concentração da solução de carregamento, da duração dos tratamentos de carregamento e desidratação e do método de lavagem sobre a viabilidade de algas.

Outros métodos de conservação de microalgas foram testados como, por exemplo, o encapsulamento (ELSTER et al., 2008; LUKEAOVÁ et al., 2008), cuja metodologia consiste no envolvimento de gotas de cultivo de microalgas em alginato de cálcio seguido de desidratação e dessecação até atingir cerca de 30% de umidade. As gotas são, então, submetidas à criopreservação e permanecem vitrificadas por tempo indeterminado. Maiores detalhes podem ser encontrados descritos no trabalho de revisão sobre metodologias da criopreservação de eucariontes de Taylor e Fletcher (1999). Day e colaboradores (2000) testaram protocolos alternativos em duas etapas envolvendo esfriamento a -30 ou -60°C .

A microencapsulação consiste em revestir ou no aprisionamento de um material do núcleo com um material polimérico, para gerar microesferas no intervalo de tamanho de 1-1.000 μm . Essa tecnologia versátil tem sido utilizada para encapsular uma vasta gama de produtos, tais como produtos farmacêuticos, aromatizantes, óleos voláteis, extratos de plantas, enzimas e outros. Nas últimas décadas, essa tecnologia também

tem sido aplicada para imobilizar células microbianas, devido às suas inúmeras vantagens em relação a outras técnicas de imobilização das células, tais como maior capacidade de carregamento de células, maior sobrevivência celular e aumento de produção dos produtos desejados.

O isolamento de células microbianas dentro de uma matriz polimérica semipermeável permite o isolamento físico de células a partir do ambiente externo, mantendo um microambiente interno adequado. Foi encontrada aplicação em diferentes processos biotecnológicos, tais como o encapsulamento de probióticos em indústrias alimentares, nos processos de fermentação e biotransformação que produzem antibióticos, ácidos orgânicos, de enzimas e alcoóis, bem como a descontaminação do ambiente no tratamento de águas residuais. A seleção criteriosa de materiais e métodos para a produção de microesferas é crítico para assegurar o mínimo de danos para a viabilidade das células microbianas encapsuladas. Os métodos convencionais utilizados para a microencapsulação de células microbianas são revistos juntamente com os recentes avanços nos respectivos métodos (RATHORE et al., 2013).

A viabilidade de células da cianobactéria *Synechocystis* sp. (PCC 6803) e a atividade fotossintética das células estressadas durante o encapsulamento de sílica sol-gel, incluindo cinco compostos indutores de estresse (sal, etanol, glicerol, glicina e betaína) e duas formas de exposição (durante 2 minutos e 24 h) foram monitoradas por fluorometria. As células encapsuladas da *Synechocystis* sp. (PCC 6803) sobreviveram ao encapsulamento e puderam permanecer ativas pelo menos por oito semanas com ligeira degradação na eficiência do PSII. A sobrevivência pós-encapsulamento foi melhorada em géis sem aditivo, quando comparado com géis contendo polietileno glicol (PEG) ou glicerol, tendo este demonstrado ter efeito prejudicial sobre *Synechocystis* sp. (PCC 6803), reduzindo a eficiência da fotossíntese em 75%, possivelmente por interromper a transferência

de excitação entre os ficobilissomas e os fotossistemas. O crioprotetor PEG foi igualmente deletério (DICKSON et al., 2011).

Avaliações da viabilidade de quatro microalgas, criopreservadas usando encapsulamento/desidratação, revelaram que todas as estirpes sofreram redução fotossintética durante a recuperação precoce pós-criopreservação. A lesão ocasionada nas células pelo processo de criopreservação foi reversível (ELSTER et al., 2008).

Lukešová e colaboradores (2008) relataram a aplicabilidade bem sucedida do processo de encapsulamento/desidratação com alginato realizada em uma coleção de cultura de pesquisa contendo uma diversificada gama de microalgas de procedências amplas e variadas. Para as estirpes mais sensíveis e, particularmente, aquelas que não-axênicas, recomenda-se a utilização de agente penetrante, com exceção da sacarose.

2.7 Recuperação de Microalgas Preservadas

As estirpes de microalgas mantidas *in vivo* pelos métodos de criopreservação ao serem reavivadas ou crescidas novamente em meio de cultura exigem cuidados especiais nos procedimentos de recuperação celular. O descongelamento das estirpes, da mesma forma que o congelamento, é um processo delicado. As células são submetidas à temperatura ambiente, lavadas com solução salina ou água esterilizada com centrifugação para retirada do produto químico utilizado como crioprotetor e transferidas para meio de cultivo novo. O cultivo deve permanecer por pelo menos 12 horas sem exposição à luz para evitar a fotoinibição das células.

A capacidade de resistir à criopreservação, usando encapsulamento/desidratação foi avaliada em vinte e sete estirpes de algas altamente diversas, isoladas de solo de diferentes procedências e habitat.

A sobrevivência acima de 50% mostra que a tolerância à desidratação osmótica e à dessecação por evaporação foi fundamental para o sucesso do método e a substituição de sorbitol para o pré-tratamento osmótico ou a combinação de encapsulamento com redução da taxa controlada em duas etapas (LUKEAOVÁ; HROUZEK; HARDING et al., 2008). Harding e colaboradores (2008) também analisaram a recuperação de 14 estirpes de microalgas terrestres eucarióticas, preservadas pela técnica de encapsulação/desidratação e observaram que estas apresentavam diferentes graus de tolerância à desidratação osmótica e dessecação. Os autores argumentaram que a transferência bem sucedida dessa tecnologia de encapsulamento/desidratação pode ser uma alternativa viável para a taxa controlada de refrigeração para preservar algas em coleções de culturas internacionais, porque o método apresenta versatilidade para criopreservar diversas espécies de microalgas.

O rompimento das cápsulas seguido de crescimento de algas em ágar foi considerado o método mais confiável e preciso de avaliar a sobrevivência da célula após o encapsulamento/desidratação (DAY et al., 2007).

Beaty e Parker (1992) estudaram a capacidade de recuperação de diversos grupos taxonômicos de microalgas, de 13 classes, do congelamento a -196°C e do descongelamento, usando diversos crioprotetores e concentrações. Esses autores obtiveram menos de 77% de sucesso de recuperação de 283 estirpes (240 espécies e 68 gêneros) criopreservadas a -196°C com o uso de diversos crioprotetores. Nesse procedimento de recuperação, os autores utilizaram o descongelamento rápido e a manutenção da microalga em meio de cultura semissólido (1% ágar), com baixa luminosidade ($17\text{-}22 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Diversas concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, glicerol, dimetilsulfoniopropionato (DMSP), dimetilsufito (DMS), meio com polivinilpironoliodione contendo 40.000

mol (PVP-40), trealose e a combinação DMSO + trealose e metanol + trealose foram testados para os gêneros *Colvacean*, *Polytonella*, *Euglena*, *Neochloris*, *Chlorella* na concentração de 10^{-1} células mL^{-1} . Os dados indicaram que, nas condições do protocolo de criopreservação, o melhor desempenho foi com o crioprotetor DMSO a 5% (v/v), seguido de metanol (10%, v/v), glicerol (10%, m/v), DMSP (1% m/v), DMS (5% v/v), DMSP (5% m/v) e, por fim, PVP-40 (10% m/v).

Considerações finais

O estabelecimento de uma coleção de microalgas envolve uma discussão institucional e, além dos critérios técnicos, uma política de gestão para sua formação, envolvendo a disponibilização de recursos financeiros para manutenção dos espécimes e de mão de obra especializada.

O isolamento, identificação, caracterização e manutenção de estirpes de microalgas em coleção possibilitam a formação de recursos humanos e também as pesquisas para obtenção de produtos biotecnológicos economicamente importantes, provenientes de tecnologias que utilizem microrganismos. Contudo, os procedimentos de manutenção de estirpes de microalgas podem ser dispendiosos tanto em relação à necessidade de mão de obra especializada quanto em relação ao custo financeiro. Em função disso, metodologias adicionais de preservação devem ser testadas para uma manutenção menos trabalhosa e mais eficiente de uma coleção de microalgas.

A integração dos bancos de microrganismos em redes interinstitucionais já é uma realidade para diferentes microrganismos. No que tange às microalgas, o compartilhamento e a disponibilização de informações relacionadas ao tema irá promover o melhor desenvolvimento de bancos ativos e os serviços prestados.

Referências

- ABURAI, N. et al. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 237-243, 2013.
- ACREMAN, J. C. The University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria (UTCC): a Canadian phycological resource centre. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 79, p. 135-144, 2004.
- ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, New York, v. 4, p. 1-4, 1968.
- ALLEN, M. M.; STANIER, R. Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae. **Journal of General Microbiology**, London, v. 51, n. 2, p. 199-202, 1968.
- AMARAL, R. et al. Is axenicity crucial to cryopreserve microalgae? **Cryobiology**, Rockville, v. 67, n. 3, p. 312-320, 2013.
- AMARAL, R.; SANTOS, M. F.; SANTOS, L. M. A. Overcoming recalcitrance in *Porphyridium aerugineum* geitler employing encapsulation-dehydration cryopreservation methods. **Cryo-Letters**, London, v. 30, n. 6, p. 462-472, 2009.
- ANDERSEN, R.; KAWACHI, M. Traditional microalgae isolation techniques. In: ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 83-100.
- ANDERSEN, R. A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 91, n. 10, p. 1508-1522, 2004.
- ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 589 p.
- AUINGER, B. M.; PFANDL, K.; BOENIGK, J. Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 8, p. 2505-2510, 2008.

BANERJEE, C.; BANDOPADHYAY, R.; SHUKLA, P. A simple novel agar diffusion method for isolation of indigenous microalgae *Chlamydomonas* sp. CRP7 and *Chlorella* sp. CB4 from operational swampy top soil. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 52, n. 4, p. 710-712, 2012.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. (Ed.). **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008. 301 p.

BEATY, M. H.; PARKER, B. C. Cryopreservation of eukaryotic algae. **Virginia Journal of Science**, Richmond, v. 43, n. 4, p. 403-410, 1992.

BENCH, S. R. et al. Whole genome comparison of six *Crocospheera watsonii* strains with differing phenotypes. **Journal of Phycology**, New York, v. 49, n. 4, p. 786-801, 2013.

BENSON, E. E. et al. Standard PREanalytical codes: a new paradigm for environmental biobanking section explore in algal culture collections. **Biopreservation and Biobanking**, New Rochelle, v. 9, n. 4, p. 1-12, 2011.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. (Ed.). **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. 502 p.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D. C.; PICCIN-SANTOS, V. Genetic Diversity of Brazilian Cyanobacteria Revealed by Phylogenetic Analysis. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 209-216, 2011.

BRANDÃO, C. J. et al. (Ed.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2011. 326 p.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Sistema de avaliação da conformidade de material biológico**. Brasília: SENAI/DN, 2002. 102 p.

BRODIE, J. et al. Endangered algal species and how to protect them. **Phycologia**, Berkeley, v. 48, n. 5, p. 423-438, 2009.

CAÑAVATE, J. P.; LUBIAN, L. M. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. **Marine Biology**, New York, v. 124, n. 2, p. 325-334, 1995.

- CHETVERIKOVA, E. DNA damage by reactive oxygen species in cryopreservation and the antioxidant properties of cryoprotectors. **Biophysics**, Moscow, v. 57, n. 2, p. 263-269, 2012.
- CHO, D.-H. et al. Novel approach for the development of axenic microalgal cultures from environmental samples. **Journal of Phycology**, New York, v. 49, n. 4, p. 802-810, 2013.
- CHO, K. W.; JUN MO, S. Screening and characterization of eicosapentaenoic acid-producing marine bacteria. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 215-218, 1999.
- CHOI, G.-G. et al. Induction of axenic culture of *Arthrospira/Spirulina*;) *platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 87-92, 2008.
- CHU, C. Y. et al. Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalgae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 20, n. 8, p. 817-825, 2004.
- CORBETT, L. L.; PARKER, D. L. Viability of lyophilized Cyanobacteria (Blue-Green Algae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, n. 6, p. 777-780, 1976.
- DAY, J.; BENSON, E.; FLECK, R. In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Largo, v. 35, n. 2, p. 127-136, 1999.
- DAY, J. G. Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections **Nova Hedwigia**, Berlin, n. 1-2, p. 191-205, 2004.
- DAY, J. G.; BRAND, J. J. Cryopreservation Methods for Maintaining Microalgal Cultures. In: ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**, Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2005. v. 2.
- DAY, J. G.; FLECK, R. A.; BENSON, E. E. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 369-377, 2000.
- DAY, J. G. et al. The use of physical and virtual infrastructures for the validation of algal cryopreservation methods in international culture collections. **Cryo-Letters**, London, v. 28, n. 5, p. 359-376, 2007.

DAY, J. G. et al. Conservation of microalgal type material: Approaches needed for 21st century science. **Taxon**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 3-6, 2010.

DAY, J. G.; STACEY, G. N. **Cryopreservation and freeze-drying Protocols**. Totowa: Humana Press, 2007. 367 p.

DAY, J. G.; STACEY, G. N. Cryopreservation of microalgae and Cyanobacteria. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 368, n. 2, p. 141-151, 2008.

DAY, J. G. et al. Long-term viability of preserved eukaryotic algae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, p. 121-127, 1997.

DICKSON, D.; ELY, R. Evaluation of encapsulation stress and the effect of additives on viability and photosynthetic activity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 encapsulated in silica gel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, n. 6, p. 1633-1646, 2011.

ELLIOTT, L. G. et al. Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection. **Algal Research**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 102-113, 2012.

ELSTER, J. et al. Deployment of the encapsulation/dehydration protocol to cryopreserve polar microalgae held at the Czech Republic Academy of Sciences Institute of Botany. **Cryo-Letters**, London, v. 29, n. 1, p. 27-28, 2008.

ESTEVEZ-FERREIRA, A. et al. Comparative evaluation of different preservation methods for cyanobacterial strains. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 25, p. 919-929, 2013.

FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; ACIÉN FERNANDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 86, n. 1, p. 27-40, 2010.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Legislação e guias de boas práticas referentes às atividades das coleções biológicas**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/legisla>. Acesso em: 10 jun. 2014.

GODHE, A.; ANDERSON, D. M.; REHNSTAM-HOLM, A.-S. PCR amplification of microalgal DNA for sequencing and species identification: studies on fixatives and algal growth stages. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 375-382, 2002.

GUERMAZI, W. et al. Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me₂SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 175-181, 2010.

GUILLARD, R. R. L. Purification methods dor microalgal. In: ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**: Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 117-132

GUIMARÃES, J. et al. **Colheita, identificação e conservação de microalgas**. Coimbra: ACOI. Algoteca do Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2009. 88 p.

GUSTAVS, L. et al. Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matric stress. **Protoplasma**, Leipzig, v. 243, p. 3-14, 2010.

HARDING, K. et al. Deployment of the encapsulation/dehydration protocol to cryopreserve microalgae held at the Sammlung von Algenkulturen, Universitat Göttingen, Germany. **Cryo-Letters**, London, v. 29, n. 1, p. 15-20, 2008.

HAWKINS, P. R. et al. Change in cyanobacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 1033-1043, 2005.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, Rockville, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZONIA (INPA). **Coleções biológicas Manaus**. Disponível em: <https://www.inpa.gov.br/colecoes/colecoes2.php>. Acesso em: 17 fev. 2014.

JONES, A. K.; RHODES, M. E.; EVANS, S. C. The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 185 - 196, 1973.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. Fixação. In: _____. (Ed.). **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: Ed. Universidade Rural, 1997. p. 85-95.

- LEPESTEUR, M.; MARTIN, J. M.; FLEURY, A. A comparative study of different preservation methods for phytoplankton cell analysis by flow cytometry. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 93, p. 55-63, 1993.
- LIMA, M. D. D. et al. Um olhar sobre a regulamentação brasileira do uso da biodiversidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 2871-2882, 2013. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20BIOLOGICAS/um%20olhar.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.
- LORENZ, M.; FRIEDL, T.; DAY, J. G. Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. In: Andersen, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 145-156.
- LOURENÇO, S. O. Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 79, n. 1-2, p. 149-173, 2004.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.
- LUKEAOVÁ, A. et al. Deployment of the encapsulation/dehydration protocol to cryopreserve diverse microalgae held at the Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic. **Cryo-Letters**, London, v. 29, n. 1, p. 21-26, 2008.
- MACEDO, N. A. Métodos histológicos. _____. **Manual de técnicas em histologia vegetal**. Feira de Santana: UEFS, 1997. p. 19-23.
- MARGALITH, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 51, n. 4, p. 431-438, 1999.
- METZGER, P.; LARGEAU, C. *Botryococcus braunii* a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 66, n. 5, p. 486-496, 2005.
- MÜLLER, J. et al. Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 94, n. 5, p. 799-808, 2007.

- NAKANISHI, K.; DEUCHI, K.; KUWANO, K. Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 24, n. 6, p. 1381-1385, 2012.
- NICHOLS, H. W. Growth media – freshwater. In: STEIN, J. (Ed.). **Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. p. 7-24.
- ÖRDÖG, V. et al. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 24, p. 907-914, 2012.
- OSORIO, H. C. et al. First attempt to cryopreserve strains from the Coimbra collection of algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 79, n. 1-2, p. 227-235, 2004.
- PARK, Y. et al. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 598, n. 1, p. 219-228, 2008.
- PEREIRA, H. et al. Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 1, p. 61, 2011.
- PONCET, J.-M.; VÉRON, B. Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 23, p. 2017-2022, 2003.
- PRASAD, R. et al. Isolation, identification and germplasm preservation of different native *Spirulina* species from Western Mexico. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 4, p. 65-71, 2013.
- PUNCOCHAROVA, M. The contemporary methods to maintain algae blue green algal cultures. **Novitates botanicae Universitatis Carolinae**, Praha, v. 4, p. 7-12, 1988.
- RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, n. 4, p. 486-501, 2010.
- RASTOLL, M. J. et al. The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 25, p. 1483-1493, 2013.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, London, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.

- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 728 p.
- RIPPKA, R. Isolation and purification of cyanobacteria. **Methods in enzymology**, Berlin, v. 167, p. 3-27, 1988.
- RISMANI-YAZDI, H. et al. Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 74, 2012.
- SANTOS, M.; AZANZA, R. Responses of *Pyrodictum bahamense* var. *compressum* and associated cultivable bacteria to antibiotic treatment. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, p. 1-11. 2011.
- SMITHSONIAN INSTITUTION NATIONAL MUSEUM OF NATURAL HISTORY. **Collection and preservation of algae**. Society for Amateur Scientists, 2014.
- SOLA, M. C. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.
- SUN, X. et al. Using an RSP3 reporter gene system to investigate molecular regulation of hydrogenase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 341-351, 2013.
- TAYLOR, R.; FLETCHER, R. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 5, p. 481-501, 1999.
- WEISS, T. et al. Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 11, p. 833-839, 2011.
- WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTION (WFCC). **Guidelines for establishment and operation of cultures of microorganisms**. Bruxelas, 2010. Disponível em: http://www.wfcc.info/index.php/wfcc_library/guideline/. Acesso em: 10 jun. 2014.
- ZHANG, E. et al. Cryopreservation of marine diatom algae by encapsulation-vitrification **Cryo-Letters**, London, v. 30, n. 8, p. 224-231, 2009.

CAPÍTULO 3

AMBIENTE DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS

Antônio Costa

Graziela Moraes de Cesare Barbosa

Mario Miyazawa

Patrícia Cristina Gomes

Iara Cintra de Arruda Gatti

Introdução

A produção sustentável de energia representa uma questão a ser equacionada no século XXI e a produção de biocombustíveis pode contribuir de forma promissora para que essa equação seja resolvida com economicidade e baixo impacto ambiental.

Nesse contexto, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas apresenta como vantagens: potencial para alcançar alta produtividade; ocupar menos área que os cultivos de plantas agrícolas oleaginosas; capacidade de absorver nutrientes de meios residuais; e, elevada eficiência no uso de água.

Um dos fatores decisivos para o sucesso do cultivo de microalgas é o conhecimento de fatores envolvidos no seu crescimento, que está relacionado diretamente a uma série de condições bioquímicas e biológicas. Dentre os fatores que podem influenciar seu crescimento (MIAO et al., 2004; RICHMOND, 2004), podem ser citados: temperatura; luminosidade; agitação; pH; nutrientes; tipo de biorreator; idade do inóculo; concentração inicial de biomassa; e, densidade populacional.

Este capítulo tratará desses fatores, relacionando-os ao processo de crescimento em ambientes de cultivo.

3.1 Fatores que Influenciam o Cultivo de Microalgas

3.1.1 Temperatura

A temperatura afeta a composição, a taxa metabólica e o crescimento celular das microalgas. Para a manutenção de culturas de microalgas, a temperatura varia de acordo com a espécie (JAMES et al., 1989) e deve ser escolhida em função do local em que cada espécie foi coletada (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; LAURA et al., 2006). Microalgas provenientes de ambientes polares devem ser cultivadas em temperaturas

abaixo de 10°C, de ambientes temperados entre 10°C e 25°C e nos demais ambientes tropicais em temperatura superiores a 20°C. A escolha da temperatura específica baseia-se na composição do meio e na espécie escolhida para cultivo, contudo, usualmente, os cultivos toleram faixas de temperatura entre 16°C e 27°C (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; LOURENÇO, 2006).

Para o gênero *Spirulina*, a temperatura ótima de crescimento é de 30-40°C (RICHMOND, 1990), porém, de acordo com Andrade e Costa (2007), elas suportam temperaturas mínimas de 8°C e máximas de 46°C. Algumas microalgas são tolerantes a temperaturas elevadas, como o gênero *Chlorella*, que mantém seu desenvolvimento em temperaturas até 42°C, mas são cultivadas, normalmente, entre 25°C e 35°C (OGBONNA et al., 1996).

Temperaturas constantes são desejáveis no cultivo desses microrganismos, pois proporcionam maior estabilidade em experimentos e maior reprodutibilidade dos resultados. O controle da temperatura nos cultivos em laboratório é facilmente alcançado em salas climatizadas, enquanto nos cultivos em escala comercial, esse controle é dificultado. A dificuldade da manutenção da temperatura ocorre em função das flutuações sazonais e diurnas, representando uma das principais limitações para a produção de biomassa de microalgas, sendo responsável, muitas vezes, pela baixa produtividade em tanques abertos (SOARES; DINIARA, 2010). A produção de lipídeos e ácidos graxos por microalgas também pode ser influenciada pela temperatura. O aumento da temperatura da cultura microalgal causa aumento no teor de proteínas e diminuição nos teores de carboidratos e lipídeos das células. Além disso, com o aumento da temperatura, muitas espécies diminuem os percentuais de ácidos graxos insaturados e aumentam os percentuais dos ácidos graxos saturados da fração lipídica (MORTENSEN et al., 1988). O grau de insaturação dos ácidos graxos está associado à fluidez da camada fosfolipídica da membrana celular, que se torna menos fluida com uma diminuição do número de insatu-

rações na cadeia de ácidos graxos. Esses efeitos são indicativos de interrupções dos processos de dessaturação das cadeias de ácidos graxos em altas temperaturas (RENAUDL et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1999).

Portanto, a produção comercial das diversas espécies de microalgas depende diretamente da temperatura do ambiente, devendo estar ajustada à faixa mais adequada para a espécie a ser cultivada.

3.1.2 Luminosidade

A luz é essencial para o desenvolvimento das microalgas fotoautotróficas. A quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, influenciando a produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas microalgais (DERNER, 2006).

Baixa intensidade luminosa favorece a obtenção de biomassa rica em clorofila, enquanto alta intensidade favorece os parâmetros de crescimento (DANESI et al., 2004).

As microalgas não fazem distinção entre luz natural e artificial, mas têm muita sensibilidade a altas intensidades luminosas, bem como a alterações do ciclo claro/escuro (ROCHA et al., 2003).

A fonte de luz é classificada em termos de fotoperíodo (horas de luz: horas de escuro, ou seja, tempo de exposição à luz ou fotófase) e qualidade e intensidade espectral (comprimento de onda) (DUBINSKY, 1990). A luz varia tanto no espaço (profundidade e latitude) quanto no tempo (diariamente e sazonalmente), implicando diretamente no crescimento microalgal (DARLEY, 1982).

É particularmente comum o uso de 12 horas de luz: 12 horas de escuro para fins de manutenção de cultivos em laboratório, já em cultivos experimentais, 16 horas de luz: 8 horas de escuro, dependendo dos objetivos. Ou seja, a adoção de fotoperíodo longo ou de luz contínua é mais comum em

cultivos com finalidade comercial, em que a exposição das microalgas a períodos maiores de luz tende a estimular maior desenvolvimento dos cultivos (LOURENÇO, 2006).

A luz utilizada pelas algas fotossintetizantes encontra-se na faixa espectral da radiação solar de 400 nm a 700 nm, que corresponde à radiação fotossinteticamente ativa absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (unidades fotossintéticas). Esses pigmentos são classificados em três grupos: as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas, sendo que cada um difere em sua composição química e apresenta diferentes capacidades de absorver luz em determinado comprimento de onda (SUH et al., 2003).

As lâmpadas fluorescentes mais adequadas ao cultivo de microalgas são as de luz fria, luz branca quente ou as do tipo luz do dia. Nas salas de cultivo (câmaras de crescimento), recomenda-se a utilização de lâmpadas do mesmo tipo e potência. Geralmente, são utilizadas lâmpadas de 40 W ou de 20 W (LOURENÇO, 2006). De acordo com Lourenço (2006), os melhores resultados com cultivos microalgais são alcançados com iluminação artificial fluorescente.

A quantidade de luz absorvida pelas células microalgais em suspensão dependem de vários fatores, que incluem a distribuição das células no meio de cultura, a densidade celular e a pigmentação das células (RUBIO et al., 2003; SUH; LEE, 2003; LEE et al., 2006).

O aumento da concentração celular microalgal no decorrer do cultivo gera o efeito de autossombreamento entre as células, diminuindo a quantidade de luz disponível por célula. Como resultado, a eficiência fotossintética diminui, acarretando diminuição da produtividade de biomassa (SOARES; DINIARA, 2010).

O aumento da intensidade luminosa gera aumento da produtividade de biomassa até certo nível. A partir de determinado ponto, os fotossistemas das unidades fotossintéticas são danificados e a produtividade de biomassa diminui. Esses danos causados pelo excesso de luz são descritos como fotoini-

bição (RUBIO; CAMACHO; SEVILLA et al., 2003; RICHMOND, 2004). Entretanto, esse fenômeno também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas, se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes como, por exemplo, baixas temperaturas (SAMUELSSON et al., 1985).

Portanto, é importante manter um nível adequado de luz durante todo o período de cultivo celular ou utilizar essa luz de forma eficiente, expondo as microalgas a pequenos períodos cíclicos de claro/escuro (RICHMOND, 2000).

O controle da luz somente não induz o crescimento da biomassa algal. A agitação do meio exerce grande influência sobre a distribuição da luminosidade em cultivos microalgais, sendo vital na avaliação da cinética de crescimento (SERENOTTI et al., 2004). Jourdan (2001) afirma que altas intensidades luminosas, sem agitação do meio de cultivo, causam fotólise ou fotodestruição das células, devido ao efeito fotoelétrico, justificando a prática da agitação. Além disso, altas intensidades luminosas com alta agitação propiciam crescimento ótimo, em uma condição em que todos os filamentos recebem cargas frequentes de luz, mas ao mesmo tempo, são constantemente sombreadas por outros filamentos, promovendo proteção contra exposição excessiva à luz. Por outro lado, baixa intensidade luminosa com baixa agitação propicia baixo crescimento, mas a pigmentação é favorecida, ou seja, a coloração se torna verde escura e o azul da ficocianina se torna aparente.

As condições de iluminação do cultivo também afetam a fração lipídica da biomassa. Reboloso-Fuentes et al. (2000), em seus estudos com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, concluíram que ao aumentar a irradiância houve aumento da produtividade de biomassa, porém, o teor de lipídeos diminuiu.

3.1.3 Aeração

O processo de agitação de uma suspensão microalgal torna-se igualmente importante, pois permite que as células fiquem suspensas no meio, melhora a eficiência da utilização da luz, favorece a troca de gases, impede a estratificação tér-

mica, auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes, evita o acúmulo de matéria orgânica no fundo do biorreator e a sedimentação das microalgas (BOYD et al., 1984; BORGHETTI, 2009); reduz, ainda, a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND, 2004). Todos esses fatores influenciam a produtividade de biomassa microalgal (SUH; LEE, 2003).

Em cultivos de microalgas realizados em escala laboratorial (pequenos volumes), a agitação pode ser realizada com o auxílio de um “*shaker*” ou através de aeração, que é feita com a injeção de ar (atmosférico ou enriquecido com CO₂), através de mangueiras de silicone no fundo do frasco ou através de bombas de aquário externas. Para que a dissolução dos gases seja mais eficiente, é necessário produzir bolhas pequenas. Esse efeito pode ser obtido pelo uso de pedras porosas ou pipetas de vidro de ponta fina na extremidade das mangueiras (LOURENÇO, 2006).

Nos cultivos em grande escala, a mistura é feita de diferentes formas, que dependem da estrutura do sistema utilizado. Tanques pequenos, geralmente localizados em ambiente coberto, podem ser agitados por meio de compressores de ar, enquanto em tanques grandes a aeração não é suficiente para assegurar uma distribuição uniforme das células. Nesse caso, a mistura é realizada por pás rotativas ou por recirculação da cultura através de bombeamento. Nos fotobiorreatores tubulares, o processo de mistura da suspensão microalgal é realizado por bombas mecânicas ou por borbulhamento de ar (LOURENÇO, 2006; BRENNAN et al., 2010).

Fast e Boyd (1992) enfatizam que a aeração mecânica é necessária, principalmente nas seguintes condições: durante a noite, devido à alta taxa de respiração das microalgas; quando as microalgas não são saudáveis (enfermas ou muito velhas) e originam menor produção de oxigênio e alto risco de morte repentina de toda a biomassa; durante a falta ou carência de luz, pois a pouca radiação (solar ou artificial) diminui substancialmente a produção de oxigênio (inibição da fotossíntese).

A grande maioria das espécies microalgais necessita de agitação, entretanto algumas sofrem efeitos adversos quando submetidas à areação. Estas, geralmente, possuem paredes celulares frágeis ou ausentes ou, ainda, têm hábito de crescimento lento (BARSANTI; LAURA; PAOLO GUALTIERI, 2006; LOURENÇO, 2006).

Assim, para uma produção satisfatória de biomassa algal é necessário um ambiente de temperatura, luminosidade e agitação equilibrados e adequados a cada espécie.

3.1.4 pH

O pH é um dos parâmetros mais importantes no processo de cultivo de microalgas, pois determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio e influencia direta ou indiretamente o metabolismo das algas. O pH depende de vários fatores como composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade do CO_2) e atividade metabólica das células (BECKER, 1995).

Elevações do pH podem ocorrer em função do metabolismo autotrófico, quando o íon bicarbonato do meio se desidrata, formando CO_2 para a fotossíntese e íons OH^- (SHIRAIWA et al., 1993). A liberação de CO_2 no meio causa redução no pH, que deve ser mantido em valores entre neutro a alcalino, para a maioria das espécies de microalgas (RAVEN, 1990).

De acordo com Bertoldi et al. (2007), o aumento da densidade celular das microalgas faz com que a atividade fotossintética reduza o teor de CO_2 no meio de cultivo, aumentando, conseqüentemente, o pH. Esse aumento faz com que ocorra a formação de gás de amônia a partir da dissociação do íon amônio, que é tóxico para microalgas. Estudos reportam que a fotossíntese algal é inibida com concentração de amônia acima de 28 mg L^{-1} em cultivos com pH acima de 8,0 (AZOV et al., 1982).

Cada espécie de microalga possui uma faixa de pH adequada para seu crescimento.

3.2 Nutrientes

As microalgas apresentam alta diversidade caracterizada por atributos fenotípicos e genotípicos. Essa diversidade pode estar relacionada, ainda, com os diferentes ambientes que atuam sobre o desenvolvimento desses microrganismos. Em ambientes de água doce ocorre grande diversidade de microalgas. Apesar das diferenças estruturais e morfológicas e do meio aquático de ocorrência, as microalgas são fisiologicamente similares e apresentam metabolismo análogo ao das plantas superiores.

As microalgas aquáticas apresentam alta eficiência fotosintética, taxa de proliferação rápida, ampla adaptabilidade de tolerância a ambientes extremos e excelente desenvolvimento em cultivos intensivos, o que as tornam eficazes na captura e incorporação do CO₂ atmosférico. Para expressar essa potencialidade, as microalgas necessitam, dentre outros fatores, de nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento.

O material vegetal fresco é constituído por cerca de 80-90% de água. Quando este é seco a 60°C, por 24-48 horas, a matéria seca remanescente possui em torno de 10-20% da massa fresca inicial. Os resultados de análises químicas de material vegetal são expressos, mais frequentemente, com base na massa seca (Tabela 3.1).

Considerando que menos de 10% da massa fresca das algas é matéria seca e que 90% dessa matéria seca é constituída por carbono, hidrogênio e oxigênio, pode-se afirmar que todos os outros elementos representam 1% da massa fresca (Tabela 3.1).

A presença de um elemento em uma alga não significa, por si só, que ele tenha função essencial em sua vida. Um elemento é considerado essencial quando, conjuntamente, sua deficiência impossibilita a alga de completar seu ciclo de vida; essa deficiência deve ser específica, não podendo o elemento ser substituído por outro no desempenho de sua função; e o elemento deve estar envolvido diretamente na nutrição da alga, independentemente de seus efeitos na correção e melhoria do meio de cultivo (EPSTEIN e BLOOM, 2006).

Tabela 3.1. Composição elementar média da planta de milho e de algas e faixa de variação de elementos em algas.

Elementos	Milho ¹	Algas ²	Faixa de variação para algas
	(µg mg ⁻¹)		
Oxigênio	444	275	205-330
Carbono	436	430	175-650
Hidrogênio	62	65	29-100
Nitrogênio	15	55	10-140
Silício	12	54	0-230
Potássio	9,2	17,3	1-75
Cálcio	2,3	8,7	0-40
Fósforo	2,0	11	0,5-33
Magnésio	1,8	5,6	0,5-75
Enxofre	1,7	5,9	1,5-16
Cloro	1,4	-	-
Alumínio	1,1	-	-
Ferro	0,8	5,9	0,2-34
Manganês	0,4	0,06	0,02-0,24
Sódio	-	6,1	0,4-47
Zinco	-	0,28	0,005-1,0
Boro	-	0,03	0,001-0,25
Cobre	-	0,10	0,006-0,3
Cobalto	-	0,06	0,0001-0,2
Molibdênio	-	0,0008	0,0002-0,001

¹Resultados obtidos por Miller (1938) citado por Epstein e Bloom (2006); ²Adaptado de Hecky e Kilham (1988).

As células das algas exigem elementos em proporções relativamente fixas para se reproduzir. Essas proporções variam com o gênero das algas e, no mesmo gênero, entre espécies de algas. Apesar da frequente variação entre espécies, é possível considerar uma composição média adequada de nutrientes para o desenvolvimento de algas (Tabela 3.1). A faixa relativamente estreita de composição elementar evoluiu, presumivelmente, porque todas as células das algas têm que executar funções metabólicas e possuem, qualitativamente, exigências estruturais semelhantes (HECKY; KILHAM, 1988).

Dependendo da quantidade exigida de nutrientes pelas algas, eles podem ser denominados macronutrientes (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, silício, potássio, fósforo, sódio, cálcio, enxofre e ferro) e micronutrientes (zinco, boro, cobre, manganês e molibdênio). Alguns elementos são classificados como benéficos para o desenvolvimento de vegetais e algas, como o cobalto, o vanádio e o selênio. Nutrientes exigidos em concentrações da ordem de unidades ou centenas de $\mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca são considerados macronutrientes. Esse é o caso do nitrogênio, $55 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca, e do fósforo, $11 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca. Elementos exigidos em menores concentrações, abaixo de unidades de $\mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca são considerados micronutrientes, como o zinco, $0,28 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca. A classificação quantitativa não é, necessariamente, compatível com os critérios de essencialidade descritos anteriormente. Assim, o silício é encontrado em altas concentrações em algumas microalgas, $54 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca, e não atende os critérios de essencialidade para o crescimento das algas. De outro lado, há algas que não requerem silício para o seu crescimento. Portanto, a opção por um meio de cultivo deve atender os critérios de essencialidade dos nutrientes, as demandas específicas de cada alga e os objetivos a que se propõe o cultivo.

A composição elementar média das algas (Tabela 3.1) indica que o carbono (C) é o elemento encontrado em maior

quantidade nas algas. Esse fato decorre de sua participação em todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células. Naturalmente, o carbono não é limitante ao desenvolvimento das microalgas de água doce e diversos meios de cultivo não adicionam o nutriente em sua composição. Entretanto, considerando a relação de carbono, nitrogênio e fósforo de 39:6:1, respectivamente, na composição elementar média (Tabela 3.1), constata-se que em cultivos densos, particularmente, pode ocorrer limitação de crescimento das algas pela carência de carbono. De outro lado, a proporção entre carbono e nitrogênio na relação acima é de 6,5. O enriquecimento do meio em nitrogênio pode aumentar a velocidade de crescimento das algas e diminuir a proporção C:N, promovendo consumo rápido do carbono disponível e a consequente limitação no crescimento das algas. Nessas condições, a adição de fontes de carbono ao meio de cultivo é justificável.

O hidrogênio (H), apesar da elevada participação na composição das algas, não constitui fator limitante ao cultivo de microalgas de água doce. Ele é adquirido pela oxidação da molécula de água nas reações do fotossistema II da fotossíntese.

O oxigênio (O) é essencial nas atividades respiratórias e nos processos que necessitam de energia. Geralmente, encontra-se em altas concentrações nos meios de cultivo das microalgas de água doce. Em ambientes aquáticos que recebem ou apresentam grandes cargas de matéria orgânica, o oxigênio pode ser limitante às microalgas.

O nitrogênio (N) é o elemento mineral mais abundante nas algas (Tabela 3.1), pois é constituinte de aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas e nucleotídeos. As proteínas contêm em torno de 18% de N, que é absorvido predominantemente como nitrato e amônio. O $N-NO_3$ é a forma mais estável presente nas águas de rios e lagos. Se o suprimento de nitrogênio é abundante nos meios de cultivo, ocorre aumento nas concentrações de proteína e de clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações do nutriente são baixas no meio de

cultivo, verifica-se diminuição marcante na taxa de divisão celular e, por consequência, redução na biomassa algal. Nessa condição, a concentração de polissacarídeos e lipídeos pode aumentar muito em relação ao total de proteínas nas células.

O fósforo (P) está associado aos processos metabólitos relacionados à aquisição, estocagem e utilização de energia: açúcares fosfatados e adenosinas fosfatos (AMP, ADP e ATP), nucleotídeos e ácidos nucleicos. Portanto, é absorvido e utilizado na forma oxidada, não sendo reduzido na planta como ocorre com o nitrato e o sulfato. O P na forma orgânica somente pode ser absorvido pela planta após sua mineralização, entretanto as algas podem utilizar açúcares fosfatados como fonte do nutriente, ainda que requerendo hidrólise enzimática. Esse comportamento é, possivelmente, uma adaptação das algas à distribuição heterogênea de P no ambiente; entretanto, quando a concentração do nutriente é alta, elas podem tornar-se uma fonte de poluição do meio. Assim como o N, o P é um dos nutrientes limitantes ao crescimento do fitoplâncton, em razão de sua demanda e grande variabilidade de concentração no ambiente natural. Em meios de cultivo para microalgas, utiliza-se P em concentrações relativamente elevadas.

O potássio (K), embora seja o mais abundante mineral catiônico constituinte das algas (Tabela 3.1), não é um constituinte integral de qualquer metabólito isolado em algas. Ao contrário, ele está presente como íon livre (K^+) em altas concentrações, o que o torna o maior agente osmótico catiônico junto com concentrações equivalentes de ânions inorgânicos e orgânicos. As funções específicas do potássio requerem apenas uma pequena fração da concentração total encontrada nas microalgas. Essas funções estão relacionadas à ativação de enzimas, à participação no transporte por meio de membranas, à neutralização de ânions e à manutenção do potencial osmótico das microalgas.

O cálcio (Ca) cumpre múltiplas funções nos vegetais. Quantitativamente é o de maior ocorrência no apoplasto, espaço da parede celular onde ele tem pelo menos duas funções distin-

tas: interligar cadeias pécticas, contribuindo para sua estabilidade, e atuar nas propriedades mecânicas do gel péctico. O cálcio tem, ainda, papel importante na mitigação de estresses ambientais como salinidade, hipóxia, choques de frio e calor e altas concentrações de metais tóxicos como o alumínio. É um nutriente exigido em quantidades moderadas pelas microalgas (Tabela 3.1).

O magnésio (Mg) fica no centro das moléculas das clorofilas *a* e *b* e, por essa razão, é essencial às algas. O Mg participa em várias reações da fotossíntese e ativa mais enzimas que qualquer outro nutriente mineral. Entre essas ativações enzimáticas, as mais importantes são aquelas envolvidas na transferência de energia pelo ATP.

O enxofre (S) tem papel fundamental na estrutura e na regulação de proteínas, pois os grupos sulfurosos no aminoácido cisteína, frequentemente, formam pontes de bissulfeto que determinam a configuração da proteína. O S participa no transporte fotossintético e respiratório de elétrons, por meio de grupamentos ferro-enxofre. O nutriente é constituinte da metionina e cisteína, aminoácidos que integram a estrutura e o funcionamento de muitas enzimas. É exigido pelas algas, em média, na mesma quantidade que o magnésio (Tabela 3.1).

O Silício (Si) é considerado um macronutriente essencial para diatomáceas marinhas e de água doce. Essas algas possuem paredes celulares notáveis, que são pesadamente impregnadas com sílica amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$); essas estruturas são frequentemente chamadas de frústulas. Diatomáceas podem apresentar demanda por silício tão alta quanto por nitrogênio (N:Si = 1:1), conforme demonstrado na Tabela 3.1. Outros grupos de algas podem consumir Si, mas a demanda é geralmente baixa, podendo ser dispensado seu uso. Em meios de cultivo, geralmente, o Si é adicionado na forma de sais de silicato de sódio. Esses sais, entretanto, contribuem para precipitar nutrientes do meio de cultivo, devendo-se, assim, omitir o elemento, se a espécie cultivada não necessitá-lo.

O Ferro (Fe) é, quantitativamente, exigido como o Mg e o S (Tabela 3.1). O Fe, nas algas, participa em inúmeras funções como nas vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos, no transporte de elétrons, na respiração e na fotossíntese, na redução de nitrato e nitrito, na redução de sulfato e é, ainda, cofator de várias enzimas. O Fe ocorre, predominantemente, como Fe^{2+} em meios anaeróbicos e com baixo pH, sendo a forma mais solúvel desse elemento químico. O Fe^{3+} predomina em meio aeróbico, em valores de pH próximos da neutralidade, e é menos solúvel que a forma Fe^{2+} . Nos meios de cultivo, o Fe tende a formar suspensões coloidais e agregar-se à matéria particulada. É frequente a precipitação de compostos no meio de cultivo, principalmente após a autoclavagem.

Os micronutrientes, sobretudo os metálicos, participam da estrutura e da atividade de diversas enzimas que estão envolvidas em diferentes vias metabólicas das algas. Uma segunda função dos micronutrientes é a participação na organização de organelas celulares como os ribossomos. Alguns metais considerados nutrientes, como o cobre e o zinco, podem ser tóxicos para as algas, em função de sua concentração no meio. Por outro lado, metais sem função metabólica conhecida, como o cádmio, o chumbo e o mercúrio, também são tóxicos em concentrações elevadas. Em geral, a toxidez de certos metais decorre da inibição da absorção de metais nutrientes e/ou interferência no metabolismo intracelular do metal nutriente. Essas relações revelam que certos metais tóxicos atuam como antagonistas e, se presentes em altas concentrações, podem provocar deficiência em determinado metal nutriente mesmo que este esteja disponível no meio.

3.3 Gás Carbônico

Desde a década de 1980, mudanças são percebidas no clima mundial. Estudos comprovam que a ação do homem é responsável pelo aumento da emissão de gases que provocam o

efeito estufa. A fixação de gás carbônico pelo cultivo de microalgas é um dos métodos mais promissores para a redução dos gases do efeito estufa (SATO et al., 2006).

Os microrganismos fotossintéticos, em especial as microalgas, têm sido utilizados no sequestro e assimilação do dióxido de carbono. As fontes de nutrientes como carbono e nitrogênio no cultivo de microalgas representam importantes componentes, de modo que reduzir a quantidade de meio inorgânico, sem perder em produtividade, pode ser um artifício para minimizar custos de produção (BENEMANN, 1997). A remoção de CO_2 e óxido nítrico (NO) por microalgas pode ser um dos mais eficientes processos de redução desses gases, sem a necessidade de mudanças radicais na matriz energética mundial e nas atividades produtivas (MORAIS et al., 2008).

A carboxilização é o processo no qual as moléculas de CO_2 são fixadas na fase escura da fotossíntese e é favorecida por razões baixas de O_2/CO_2 . A fotorrespiração compete com esse processo, no qual o carbono orgânico é convertido em CO_2 sem nenhum ganho metabólico. Para atingir rendimentos ótimos em cultivo de microalgas em massa é necessário minimizar os efeitos da fotorrespiração através do enriquecimento com CO_2 , além da quantidade presente naturalmente no ar. O destino do carbono fixado dentro das células está fortemente ligado à concentração de nitrogênio no meio de cultivo, elemento que compõe cerca de 7% a 10% da massa seca das microalgas. Em geral, a produção de moléculas constituídas de nitrogênio é prejudicada em condições de suficiência do elemento. Já em concentrações limitadas de nitrogênio, o fluxo de carbono é desviado da síntese de proteínas para a síntese de lipídeos ou carboidratos ou, ainda, carotenoides secundários em algumas espécies (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; VONSHAK et al., 2004).

As algas crescem utilizando como fonte de carbono o CO_2 do ar, que contém somente 0,03% desse gás, muitas vezes sendo necessária sua adição ao cultivo (BORGHETTI, 2009).

Segundo Tsuzuki et al. (1990), a adição de CO₂ aos cultivos influencia o conteúdo lipídico e o grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo este, portanto, um nutriente essencial no cultivo de microalgas. A espécie *C. kessleri* apresentou os maiores teores lipídicos na biomassa seca comparado às demais microalgas, alcançando valores de 9,7% e 7,8% (m/m) nos ensaios com adição de 12% e 18% de CO₂, respectivamente. Para *C. vulgaris*, a concentração de lipídeos na biomassa seca variou de 3,0% a 4,6% (m/m). Em cultivo de *Chlorella* sp. HA-1 realizado com ar enriquecido com 10% de CO₂, o conteúdo lipídico alcançou 18,4% (YANAGI et al., 1995).

Estima-se que cada tonelada de biomassa algal produzida consome cerca 1,7 toneladas de CO₂ por meio da fotossíntese. Isso representa uma quantidade de vinte a quarenta vezes mais do que a absorvida por outras culturas oleaginosas (MULDER, 2009).

3.4 Meios Alternativos de Cultivo

Meios de cultura consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural. Esse meio deve suprir todas as necessidades nutritivas do microrganismo para a síntese do material celular e a produção de metabólitos de interesse industrial. Devido à ampla diversidade de microrganismos, existem vários tipos de meios de cultura para as variadas exigências nutricionais. Além dos nutrientes, é preciso fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, tais como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura e luminosidade, dentre outras.

O desenvolvimento de um processo biotecnológico requer o cultivo de células microbianas em meios de cultivo adequados, que podem ser classificados em: meios sintéticos (quimi-

camente definidos) e meios complexos. Os sintéticos são aqueles em que a composição química exata é conhecida. Alguns microrganismos necessitam de um meio definido, com muitos fatores necessários para o seu crescimento e são denominados fastidiosos ou muito exigentes em termos nutricionais. Meios quimicamente definidos são utilizados, normalmente, em trabalhos experimentais em laboratórios ou para o crescimento de seres autotróficos (TORTORA et al., 2006). Já os meios complexos, são aqueles que apresentam algum componente que tem composição variável. Nesse caso, estão incluídos extratos de leveduras, carne, plantas ou produtos da digestão proteica, como peptonas. Muitos meios complexos são fontes de carbono e nitrogênio e podem suprir de maneira satisfatória as necessidades nutricionais de alguns microrganismos e serem utilizados como um componente do meio de cultivo de forma econômica. O seu uso também tem um papel ambiental, pois evita o desperdício de material aproveitável e a poluição do meio ambiente no seu descarte (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006).

A composição nutricional do meio de cultivo depende do microrganismo que está sendo cultivado, pois cada organismo possui vias metabólicas específicas para a obtenção de energia e a produção de metabólitos. A variedade de espécies e cepas e a diversidade de tipos de microrganismos podem determinar especificidades com relação às necessidades nutricionais.

Dentre os microrganismos, as microalgas estão sendo estudadas em pesquisas biotecnológicas devido à sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006). Uma das formas de utilizá-las é no tratamento de resíduos das atividades agropecuárias, pois além de ajudar na purificação dos efluentes, a biomassa algal produzida tem alto valor biológico e econômico (RODRIGUES; BELLI-FILHO, 2004). Outra forma de utilização desses microrganismos é a extração de biomassa e lipídeos para biocombustível.

Porém, produzir microalgas utilizando reagentes químicos comerciais torna o processo de cultivo limitante, devido ao alto

custo desses produtos. Em geral, os meios de cultura são líquidos, sólidos ou semissólidos e devem proporcionar todos os elementos essenciais ao desenvolvimento de uma microalga. Mais do que isso, há elementos essenciais para certas espécies que podem ser desnecessárias para outras. Não há, entretanto, nenhum meio de cultura viável para o cultivo de todas as espécies de microalgas. Os exemplos mais bem sucedidos de meios de cultura contemplam, de forma abrangente, as necessidades nutricionais de centenas de espécies testadas e passam a ser, naturalmente, a primeira opção de meio de cultura a ser testado no caso de espécies cujas necessidades nutricionais básicas são desconhecidas (LOURENÇO, 2006). Na Tabela 3.2 são apresentados alguns meios comerciais utilizados para esse fim.

Tabela 3.2. Concentrações de alguns meios de cultura comumente utilizados no cultivo de microalgas.

Nutrientes	Zarrouk ¹	Paoletti ²	Chu ³	BBM ⁴	BG-11 ⁵
	(g L ⁻¹)				
NaHCO ₃	16,8	15,15	-	-	-
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	-	-	-	-	0,04
KH ₂ PO ₄	-	-	0,0062	0,175	-
K ₂ HPO ₄	0,5	0,50	-	-	-
KNO ₃	-	2,57	-	-	-
K ₂ SO ₄	1,0	-	-	-	-
NaNO ₃	2,5	-	-	0,25	1,5
Na ₂ SO ₄	-	1,88	-	-	-
NaCl	1,0	0,92	-	-	-

Continua.

Tabela 3.2. Continuação.

Nutrientes	Zarrouk ¹	Paoletti ²	Chu ³	BBM ⁴	BG-11 ⁵
	(g L ⁻¹)				
Na ₂ CO ₃	-	8,89	0,02	-	0,02
NaSiO ₃ ·9H ₂ O	-	-	0,025	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,25	0,025	0,075	0,075
CaCl ₂	0,04	-	-	-	0,036
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	0,05	-	0,025	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	0,02	-	-
Citrato férrico	-	-	-	-	0,006
Ácido Cítrico	-	-	-	-	3,0
Solução de e-EDTA*	0,08	-	-	-	0,001
EDTA	-	-	-	0,050	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	-	0,002	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	0,00498	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	0,001	-	-
H ₃ BO ₃	2,86	0,92	0,00248	0,01142	0,00286
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	1,54	-	-	0,0017
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	-	0,00139	-	-
MnO ₃	0,015	-	-	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	0,22	-	0,00882	0,000222
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	-	0,39	-	0,00072	0,00039

Continua.

Tabela 3.2. Continuação.

Nutrientes	Zarrouk ¹	Paoletti ²	Chu ³	BBM ⁴	BG-11 ⁵
	(g L ⁻¹)				
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	0,079	-	-	0,000079
CuCO ₃ ·5H ₂ O	0,079	-	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,038	-	0,00038	0,0000404
NH ₄ VO ₃	22,86	-	-	-	-
NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	-	-	0,001	-	-
KCr(SO ₄) ₄ ·12 H ₂ O	192	-	-	-	-
NiSO ₄ ·6H ₂ O	44,8	-	-	-	-
Na ₂ WO ₄ ·2 H ₂ O	17,94	-	-	-	-
TiOSO ₄ ·H ₂ SO ₄ ·8 H ₂ O	61,1	-	-	-	-
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	43,98	-	-	-	-
HCl (1mol L ⁻¹)	-	-	0,1 ml	-	-
Vitamina B ₁₂	-	-	0,00001	-	-
Tiamina-HCl	-	-	0,000001	-	-
Biotina	-	-	0,000001	-	-

¹Zarrouk (1966); ²Modificado de Paoletti (FERRAZ et al., 1985); ³Chu (1942); ⁴BBM (STOKES et al., 1973);

⁵BG-11 (ALLEN, (1968).

Uma solução para os elevados custos dos meios de cultivo sintéticos é o uso de meios alternativos, nos quais se procura estabelecer um substrato eficiente e, financeiramente, menos dispendioso (MOREIRA, 2007). Nesse sentido, vários meios estão sendo testados utilizando resíduos agroindustriais para

meios de cultura, como esgoto doméstico esterilizado (PIPES et al., 1959), efluentes de biodigestores (RODULFO et al., 1980), despejos industriais purificados (JUSIAK et al., 1984), vinhaça de cana-de-açúcar (CAZETTA et al., 2005), águas residuais da produção de azeite de oliva (SÁNCHEZ et al., 2001), manipueira (BORGHETTI, 2009) e resíduos da suinocultura (RODRIGUES; BELLI-FILHO, 2004). De acordo com Timofiecsyk e Pawlowsky (2000), o termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando sólidos, os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas.

Muitas vezes, esses compostos são substâncias consideradas perigosas, cujas características de toxicidade se aliam a um elevado potencial de persistência e bioacumulação (acúmulo de substâncias nos tecidos dos organismos) (DINIS et al., 2004). A grande vantagem de utilizar esses resíduos se deve ao fato de serem produzidos em grande escala e o seu descarte provocar impactos ambientais.

No Paraná, várias cadeias produtivas geram elevada quantidade de resíduos, entre as quais podemos citar: suinocultura, cana-de-açúcar, aterros sanitários e indústria de sucos de frutas.

O rebanho de suínos no Paraná é de 5.096.224 cabeças (IBGE, 2010), sendo o Estado o terceiro maior produtor nacional. Com esse rebanho efetivo, a atividade suinícola gera grande volume de dejetos, com cerca de 1,3 milhões de m³ mensais. Esse volume causa grande impacto no meio ambiente como, por exemplo, a eutrofização dos mananciais, com conseqüente desequilíbrio dos ecossistemas.

A produção de cana-de-açúcar abrange uma área de 573.833 ha, sendo o Estado responsável por 7,5% da produção brasileira, totalizando, em 2010, a produção de 1.885.121 m³ de álcool (ALCOPAR, 2011), que gerou, aproximadamente, 22 milhões de m³ de resíduo (vinhaça). A vinhaça apresenta baixo teor de matéria orgânica, não sendo uma fonte de carbono eficiente, mas é rica em fontes minerais, podendo ser utilizada na

lavouira canavieira para melhoramento do solo e suplementação de meios de cultivo.

Outra cadeia produtiva no Estado é a fruticultura, sendo a laranja uma das principais frutas produzidas no país, com 17,6 milhões de toneladas, em 2009, que responde a 42,7% do volume total da fruticultura brasileira. No Estado do Paraná, a laranjeira ocupa uma área de 20,3 mil ha e produziu 556,8 mil toneladas da fruta, em 2009 (SEAB, 2010). A tendência mundial é o crescimento contínuo na produção de frutas e o Paraná tem apresentado índices contínuos de aumento de área, contribuindo para o aquecimento dos demais setores da economia. O resíduo produzido na indústria de sucos de laranja, contendo a água de lavagem e espirros de suco, varia de 30% a 50% do suco produzido.

Outro resíduo abundante no Estado e um dos principais causadores de impactos ambientais são os produzidos em aterros sanitários. A população paranaense que reside na área urbana é de 8.912.692 habitantes (IBGE, 2010), sendo que cada habitante gera, em média, 1,3 kg de lixo por dia. Atualmente, cerca de 70% dos municípios paranaenses já possuem aterros sanitários instalados, responsáveis pela formação de gases e de lixiviado (chorume), que podem infiltrar no solo e causar poluição das águas subterrâneas. A formação do chorume em aterros sanitários ocorre, principalmente, pela: percolação de água advinda da precipitação atmosférica; pelo escoamento superficial de água, que infiltra pela cobertura do aterro; da umidade inicial contida nos resíduos depositados; e, da decomposição dos resíduos devido à atividade microbológica.

De modo geral, todos esses resíduos apresentam altos teores de nutrientes, podendo suprir, total ou parcialmente, o meio de cultivo em alguns deles. O inconveniente da utilização dos resíduos é a grande variabilidade de cada lote analisado em teores de nitrogênio, fósforo e potássio e o desequilíbrio desses nutrientes em relação à demanda das microalgas (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Análise dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nos resíduos provenientes da suinocultura, da indústria sucroalcooleira, da indústria da laranja e de aterros sanitários.

Resíduos (data de coleta)	N	P	K
	(g L ⁻¹)	(ppm)	
Resíduo suíno biodigerido (set./2010)	361,76	1.264,32	400
Resíduo suíno biodigerido (fev./2011)	283,75	23,36	320
Resíduo suíno biodigerido (set./2011)	75,18	2,041	306
Resíduo da indústria de suco de laranja (set./2010)	37,85	83,27	240
Resíduo da indústria sucroalcooleira (set./2010)	66,52	10,06	7.000
Resíduo da indústria sucroalcooleira (set./2011)	15,26	0,023	342
Resíduo de aterro sanitário (set./2010)	1.412,18	8,20	1.450
Resíduo de aterro sanitário (set./2011)	50,40	0,012	324

Para utilizar esses resíduos em larga escala em cultivos comerciais na produção de biomassa de microalgas, análises iniciais deverão ser realizadas devido à variabilidade dos teores de nutrientes.

Considerações Finais

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas pode compatibilizar o potencial de se conseguir alta produtividade com economicidade e baixo impacto ambiental.

Viabilizar essa compatibilidade passa pelo estabelecimento de sistemas de cultivo que considerem os fatores de crescimento – pH, temperatura, luminosidade, agitação do meio de cultivo, nutrientes, tipo de reator, concentração inicial e densidade populacional das microalgas. Esses fatores de crescimento devem ser adequados para cada espécie de microalga cultivada.

Particularmente, quanto à economicidade do sistema, a composição mineral do meio de cultivo, definida pelos sais dos diferentes meios sintéticos utilizados para as espécies de microalgas, deve ser considerada um critério prioritário. Esse componente é o que mais onera o custo de produção das microalgas, podendo representar até 35% do custeio de um sistema de cultivo.

Uma solução para os elevados custos dos meios sintéticos é o uso dos meios alternativos para o cultivo desses microrganismos, por meio do estabelecimento de um substrato eficiente e, financeiramente, menos dispendioso. Nesse sentido, vários resíduos estão sendo avaliados como meios de cultivo, tais como: esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores, despejos industriais purificados, vinhaça de cana-de-açúcar, manipueira e resíduos da suinocultura.

A diversidade dos resíduos impõem alterações ao meio que interferem nos fatores de crescimento das microalgas, diferentemente dos meios sintéticos. Dessa forma para cada situação de uso de resíduos no cultivo das microalgas haverá alterações no pH, na temperatura, na turbidez e na composição do meio, dentro outros fatores, o que aponta no sentido de se estabelecer critérios para o uso de cada um deles. Apesar dessas dificuldades, o uso de resíduos justifica-se pela redução dos impactos ambientais conseguido pela sua utilização como meio de cultivo alternativo, associado à diminuição dos custos de produção da biomassa das microalgas.

Referências

ALCOPAR. ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DE BIOENERGIA DO ESTADO DO PARANÁ. Disponível em: <http://www.alcopar.org.br/consecana/apresentacao.php>. Acesso em: 10 nov. 2011.

ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 4, p. 1-4, 1968.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 264, p. 130-134, 2007.

AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 735-739, 1982.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. (Ed.) **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. New York: CRC Press, 2006.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

BENEMANN, J. R. CO₂ Mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 38, p. 475-479, 1997.

BERTOLDI, F. C. et al. Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 85-92, 2007.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOYD, C. E.; MARTINSON, D. J. Evaluation of propeller-aspirator-pump aerators. **Aquaculture**, Stirling, v. 36, p. 283-292, 1984.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, p. 105-112, 2005.
- CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. Part I methods and culture media. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 30, p. 284-325, 1942.
- COSTA, J. A. V. et al. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 61, n. 1, p. 105-110, 2006.
- DANESI, E. D. G. et al. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 26, p. 329-335, 2004.
- DARLEY, W. M. Algal biology: a physical approach. In: WILKINSON, J. F. (Ed.). **Basic microbiology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982. p. 30-52.
- DERNER, R. B. **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 poli-insaturados**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- DINIS, M. A.; MONTEIRO, Á.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuárias: o papel das microalgas. **Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia**, Porto, v. 1, p. 41-54, 2004.
- DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 101-116.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: [s. n.], 2006.
- FAST, A.; BOYD, C. Water circulation, aeration and other management practices. In: FAST, A.; LESTER, J. (Ed.). **Marine shrimp culture: principles and practices**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992. p. 457-495.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 16, p. 132-137, 1985.

HECKY, R. E.; KILHAM, P. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 796-822, 1988.

IBGE. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 10 nov. 2011.

JAMES, C. M.; AL-HINTY, S.; SALMAN, A. E. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes **Aquaculture**, Stirling, v. 77, p. 337-351, 1989.

JOURDAN, J. P. Grow your own *Spirulina*. In: _____. **Manual of small scale spirulina culture**. French: Antenna Technologies, 2001. p. 1-16.

JUSIAK, M. P. et al. Intensive culture of *Chlorella vulgaris*/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. **Water Research**, New York, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1984.

LEE, J. et al. The influence of thermodynamic phase on the retrieval of mixed-phase cloud microphysical and optical properties in the visible and near-infrared region. **IEEE Geoscience And Remote Sensing Letters**, New York, v. 3, n. 3, p. 287-291, 2006.

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

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 20-39.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, p. 85-93, 2004.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1038-1042, 2008.

- MOREIRA, E. G. **Crescimento e propriedades nutricionais de *Chaetoceros muelleri* Lemmerman para aquicultura: comparação entre diferentes meios de cultivo.** 2007. 65 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.
- MORTENSEN, K. Y. B.; RAINUZZO, J. K.; KNUTSEN, G. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schiitt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 122, p. 173-185, 1988.
- MULDER, J. P. **Microalgas: a nova agricultura.** Recife, 2009. Mimeo.
- OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 82, n. 6, p. 558-564, 1996.
- OLIVEIRA, M. A. C. L. D. et al. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture International**, London, v. 7, p. 261-275, 1999.
- PIPES, W.; GOTTAAS, H. B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in sewage. **Applied Microbiology**, Washington, v. 8, p. 163-169, 1959.
- RAVEN, J. A. Sensing ph? **Pant, Cell and Environment**, Oxford, v. 13, p. 721-729, 1990.
- REBOLLOSO-FUENTES, M. M. et al. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, London, v. 70, p. 345-353, 2000.
- RENAUDL, S. M. et al. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 7, p. 595-602, 1995.
- RICHMOND, A. Outdoor mass cultures of microalgae: biological principles, production systems. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC Press, 1990. p. 285-330.
- RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 12, p. 441-451, 2000.

- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. UK: Willey-Blackwell, 2004.
- ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES, M. H. F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**, New York, v. 20, p. 237-242, 2003.
- RODRIGUES, J. B. R.; BELLI FILHO, P. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com ureia. **Biotemas**, Florianópolis, v. 17, n. 2, p. 7-26, 2004.
- RODULFO, B. R.; MARMOL, N. H. R.; EMRALINO, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. **Philippine Journal of Science**, Manila, v. 109, n. 3, p. 51-58, 1980.
- RUBIO, F. C. et al. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 81, n. 4, p. 459-473, 2003.
- SAMUELSSON, G. et al. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the Cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 79, p. 992-995, 1985.
- SÁNCHEZ, S. et al. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 13, p. 443-449, 2001.
- SATO, T. et al. Invention of outdoor closed type photobioreactor for microalgae. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 47, p. 791-799, 2006.
- SEAB. SECRETARIA ESTADUAL DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Análise da conjuntura agropecuária - safra 2010/11**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2010_2011_retificado.pdf. Acesso em: 04 nov. 2011.
- SERENOTTI, F.; CRESPI, B. A.; TORRES, L. D. G. Contribuição à modelagem da produção de *Spirulina maxima* em fotobiorreatores. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1-2, p. 8-17, 2004.
- SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n. 5, p. 649-657, 1993.

- SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- STOKES, P. M.; HUTCHINSON, T. C.; KRAUTER, K. Heavy metal tolerance in algae isolated from lakes contaminated near sudbury-Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 51, p. 2155-2168, 1973.
- SUH, I. S.; LEE, C. G. Photobioreactor engineering: design and performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Busan, v. 8, n. 6, p. 313-321, 2003.
- TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 221-226, 2000.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- TSUZUKI, M. et al. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 93, p. 851-856, 1990.
- VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Environmental stress physiology. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. UK: Willey-Blackwell, 2004. p. 57-82.
- YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 36, p. 713-716, 1995.
- ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. 1966. 86 f. Tese (Ph.D) - Université de Paris, Paris, 1966.

CAPÍTULO 4

SISTEMAS POTENCIAIS DE CULTIVO DE MICROALGAS

*Adriano Rausch Souto
Elisangela Andrade Angelo
Iara Cintra de Arruda Gatti*

Introdução

Os primeiros estudos para a produção de microalgas em grande escala foram realizados na Europa, na década de 1940. Desde então, a maioria das pesquisas e cultivos tem sido realizados com foco nos metabolismos fotoautotróficos desses seres unicelulares. Isso se deve, em grande parte, ao seu sistema biológico que, a partir da presença de luz, água e gás carbônico, sintetiza carboidratos pela fotossíntese (CHEN, 1996; CARVALHO et al., 2006).

Apesar de serem primariamente fotoautotróficas, estudos taxonômicos e bioquímicos têm demonstrado que algumas microalgas apresentam grande variedade metabólica, inclusive com espécies heterotróficas estritas e, portanto, incapazes de realizar fotossíntese (LIANG et al., 2009; BUMBAK et al., 2011). Toda essa variabilidade metabólica remete à capacidade que as microalgas possuem de viver em, praticamente, todos os ecossistemas da Terra, não só aquático, mas também em lugares terrestres úmidos, em diferentes condições ambientais (FRAC et al., 2010).

Além dessa variedade metabólica, outro fator que torna o cultivo massal das microalgas favorável é o seu rápido ciclo de vida quando comparadas, por exemplo, com vegetais terrestres, o que resulta em alta produtividade de massa por unidade de área (CHISTI, 2007b; JORQUERA et al., 2010a; HOLANDA et al., 2011; KOWALSKI, 2012).

O crescimento desses microrganismos depende de fatores biológicos, físicos e químicos. Os biológicos estão relacionados às taxas metabólicas das diferentes espécies e da possível influência de outros tipos de organismos sobre seu desenvolvimento. Já os químicos e físicos estão relacionados à concentração de nutrientes, salinidade, iluminação e temperatura do meio onde elas se encontram e/ou são cultivadas. Morais et al. (2008) relatam que, no cultivo de microalgas a concentração dos nutrientes

e do CO₂ influenciam na composição e no conteúdo dos lipídeos. Certas espécies apresentam alto potencial para serem utilizadas como suplemento alimentar humano e animal, devido, principalmente, à sua composição, rica em proteínas e ácidos graxos insaturados. Outras se destacam por possuírem elevado teor de lipídeos, os quais podem ser utilizados na fabricação de biocombustível, como alternativa na obtenção de energia limpa e promoção do desenvolvimento sustentável (RENAUD et al., 2002). Essa possibilidade tem sido mais considerada atualmente em função do aumento do preço do petróleo e da preocupação com o meio ambiente (CHISTI, 2007b).

4.1 Microalgas e Fontes de Carbono

As tecnologias para produção de biomassa a partir de microalgas podem ser classificadas quanto à sua origem, fonte de energia empregada e às vias metabólicas utilizadas. No que se refere ao metabolismo, Yang (2000), Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) e Scoparo (2010) classificam as microalgas em quatro grupos, de acordo com a sua forma de obtenção de energia e fonte de carbono (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Variabilidade metabólica das microalgas em relação à fonte de energia e carbono.

Metabolismo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânica
Heterotrófico	Compostos orgânicos	Orgânica
Mixotrófico	Luz e compostos orgânicos	Inorgânica e orgânica
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânica

4.2 Características dos Processos Metabólicos

Embora a produção massal das microalgas fotoautotróficas seja a mais comum, é importante considerar a diversidade metabólica desses microrganismos durante todo o desenvolvimento do cultivo, bem como devem ser observados e avaliados os sistemas heterotróficos e mixotróficos.

A escolha do melhor processo dependerá, então, do objetivo do projeto aliado às características das microalgas, pois as diferentes formas de cultivo apresentam vantagens, desvantagens e desafios tecnológicos próprios.

4.2.1 Sistema fotoautotrófico

Os organismos fotoautotróficos, por meio da fotossíntese, sintetizam compostos orgânicos a partir da presença de luz, água e gás carbônico, produzindo oxigênio e carboidratos, transformando radiação solar em energia química. A respiração consome oxigênio e libera o gás carbônico no ambiente. Em condições normais, a taxa de produção do oxigênio é cerca de 30 vezes superior ao consumido pela respiração, podendo ocorrer, também, momentos em que ambas são equivalentes. Os organismos clorofilados – plantas, algas e certas bactérias – captam a radiação solar e a utilizam para a produção de elementos essenciais, portanto o Sol é a fonte primária de energia (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006).

A energia solar é um recurso natural, no entanto, varia em função do ciclo diário e, para contornar essas limitações no cultivo das microalgas, pode-se recorrer à iluminação artificial, que possibilita a produção contínua, mas requer investimentos. A influência da luz na produção da biomassa está relacionada, principalmente, ao tempo de exposição à radiação e à sua intensidade (PEQUENO, 2010). A temperatura do cultivo é outro fator restritivo, pois exerce forte influência nas reações metabólicas e, conseqüentemente, sobre a taxa de crescimento das microalgas.

As microalgas necessitam de substâncias e compostos químicos que influenciam o seu crescimento, tais como: nitrogênio, fósforo, ferro e, em alguns casos, silício (CHISTI, 2007b). O nitrogênio é um elemento básico na formação das proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. Esse elemento pode ser encontrado em concentrações variáveis na biomassa das microalgas, tanto na forma orgânica como inorgânica e pode ser assimilado do meio de cultivo na forma amoniacal (NH_3 e NH_4^+) ou de nitrato (NO_3^-). Essa diferença em relação a qual forma de nitrogênio é absorvida, varia de acordo com o potencialidades metabólicas de cada espécie de microalga.

A importância dessas fontes de nutrientes foi observada por Jeong et al. (2010) e Vonshak (1997), que também constataram que os nutrientes consistem no maior componente dos custos do cultivo das microalgas. Diante disso, torna-se imperativa a pesquisa por meios alternativos para o cultivo em grande escala, já que a viabilidade econômica para a produção de biodiesel a partir de microalgas é dependente da redução de seus custos (MULITERNO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2008). Além disso, torna-se necessário um incremento na produtividade da biomassa, sem acarretar aumento dos custos para sua instalação e operação (TEIXEIRA et al., 2006).

Embora as microalgas fotoautotróficas apresentem grande versatilidade, durante sua evolução observou-se que diferentes formas de metabolismo foram selecionadas, a fim de sustentar a manutenção e, até mesmo, o seu crescimento (JEONG et al. 2010; BRUTEMARK et al., 2011; BUMBAK; COOK; ZACHLEDER et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Essa diversidade deve ser considerada durante o desenvolvimento do sistema de produção, com base nos metabolismos heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (CHEN, 1996; SHI et al., 2000; CHENG et al., 2009; CHENG et al., 2011; PEREZ-GARCIA, ESCALANTE, DE-BASHAN et al., 2011).

Embora existam diferenças entre as espécies de microalgas, os termos mixotróficos e fotoheterotróficos, muitas vezes, são

tratados como sinônimos (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; YEH et al., 2012). Dessa maneira, os cultivos que exploram essas duas formas de metabolismo serão descritos em um mesmo tópico.

4.2.2 Sistema heterotrófico

As principais características dos cultivos heterotróficos referem-se à necessidade de uma fonte orgânica para obtenção de energia e carbono. Nesses sistemas, as microalgas não realizam fotossíntese e, portanto, a cultura não requer luz (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Segundo Bumbak et al. (2011), os sistemas heterotróficos são semelhantes ao cultivo de outros microrganismos, como as leveduras utilizadas na produção de cerveja e etanol.

Até mesmo as microalgas fotoautotróficas são capazes de oxidar compostos orgânicos para obter energia. O que difere estas das heterotróficas é a origem da fonte desses compostos, pois nas fotoautotróficas, o carbono orgânico tem origem no processo interno da fotossíntese, enquanto nas heterotróficas, o carbono orgânico é captado do meio externo (PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011). Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) observaram que muitas espécies de microalgas são classificadas como fotoautotróficas obrigatórias, não por serem incapazes de metabolizar internamente tais compostos orgânicos, mas por não conseguirem transportá-los para o interior da célula.

Hallmann e Sumper (1996) manipularam geneticamente uma microalga do gênero *Volvox*, fotoautotrófica estrita, a qual recebeu um gene de enzimas transportadoras de compostos de carbono orgânico, originário de uma *Chlorella*. Os pesquisadores observaram que, após a inserção do gene, *Volvox* sp. foi capaz de crescer heterotroficamente.

Em ambientes com pouca radiação de luz e com a presença de determinados compostos orgânicos, algumas microal-

gas fotoautotróficas foram capazes de assimilar esses materiais. No entanto, tais espécies não conseguiram sustentar o metabolismo heterotrófico por um tempo suficiente para duplicar-se. Assim, para que seja considerada heterotrófica, ela deve ser capaz de manter esse tipo de metabolismo para crescer (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011).

Azma et al. (2011) revelaram que a capacidade do crescimento heterotrófico está presente em vários gêneros de microalgas e possui uma relação com as seguintes características: permeabilidade celular; difusão e transporte do carbono orgânico pela membrana; e, dos fatores enzimáticos existentes no interior das células. A maior parte dessas características determinantes do metabolismo heterotrófico refere-se à forma de entrada do carbono orgânico no interior da célula.

As principais fontes de carbono para o crescimento heterotrófico das microalgas são carboidratos e ácidos orgânicos, tais como: glicose, ácido acético e glicerol (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; BUMBAK; COOK; ZACHLEDER et al., 2011; PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011). Essa capacidade de utilizar determinada fonte de carbono varia em função da espécie, pois depende do potencial de transporte do material orgânico para o interior da célula, bem como de seu estoque enzimático. Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), a produtividade da biomassa no cultivo heterotrófico é comparável ao de outros microrganismos aeróbicos, nos quais as taxas de respiração e crescimento tendem a ser melhores com a glicose do que com qualquer outra fonte de carbono. Isso ocorre porque a glicose libera $2,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, ou seja, mais energia por mol do que outras fontes como, por exemplo, o acetato, que libera apenas $0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011).

A presença da glicose no meio de cultivo promove alterações na composição enzimática e na fisiologia celular. O tempo decorrido entre a presença da glicose e as alterações

no conteúdo enzimático é bastante variável entre as espécies, podendo levar de alguns minutos até várias horas. Esse período está relacionado à duração da fase lag dos cultivos heterotróficos, a qual corresponde ao período de adaptação fisiológica da célula às condições do meio. Deve-se utilizar um bom inóculo para diminuir a fase lag ou, até mesmo, torná-la inexistente, como destacado por Chojnacka et al. (2011).

A quantidade da glicose no meio de cultivo também possui relação com a duração da fase lag sendo que, em altas concentrações, a fonte de carbono pode comprometer ou até inibir o crescimento das células. Wu e Shi (2007) relatam que a produção de biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* evoluiu na medida em que se elevou a concentração de glicose. Contudo, a taxa de crescimento específica diminuiu à medida que o nível desse açúcar aumentou, ou seja, em altas concentrações o tempo para a microalga alcançar a biomassa máxima produzida foi superior.

Shi et al. (1999) demonstraram que elevadas concentrações de glicose inibem o crescimento das microalgas sendo que, essa composição varia muito entre as espécies. Para *Chlorella saccharophila*, a resposta aconteceu quando o meio atingiu níveis superiores a 25 g L⁻¹ de glicose. Para *C. sorokiniana*, essa situação somente ocorreu em meios com mais de 5 g L⁻¹, já para *C. protothecoides*, o máximo de crescimento foi obtido com valores próximos a 85 g L⁻¹ de glicose; sendo que a inibição só se manifestou em concentrações acima de 100 g L⁻¹ de glicose (PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011).

Como não necessita da luz, o cultivo heterotrófico não apresenta problemas relacionados ao sombreamento decorrente do aumento da densidade. Isso diminui os custos com a separação da biomassa, pois quanto mais densa a produção, mais facilmente pode ser separada do meio de cultivo (OGBONNA et al., 1997; LIANG; SARKANY; CUI, 2009; PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011).

O fato de não depender de uma fonte luminosa também facilita o cultivo heterotrófico em grandes volumes, o que contribui para o aumento de escala do sistema (CHENG; ZHOU; GAO et al., 2009). Ao estudarem o sistema de cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides* para produção de biodiesel, em três unidades com: 5, 750 e 11.000 L, Li et al. (2007) não observaram variações consideráveis da densidade de biomassa nos três volumes. Como o cultivo heterotrófico é concentrado em biorreatores com grandes volumes, a área utilizada para esses sistemas é menor do que a área requerida para a produção massal dos sistemas fotoautotróficos (SHEN et al., 2010).

Segundo Azma et al. (2011), o aumento de escala do cultivo heterotrófico pode se beneficiar das técnicas já desenvolvidas e projetadas para sistemas industriais, tornando mais breve a viabilidade técnico-econômica da produção de microalgas. Os biorreatores utilizados nos cultivos de microrganismo permitem um controle adequado dos principais parâmetros de monitoramento, independentemente das condições do clima (CHEN, 1996; SHEN; YUAN; PEI et al., 2010).

A comparação da produtividade dos diferentes sistemas nem sempre é possível, pois existe grande amplitude nas metodologias utilizadas para obtenção de dados, bem como nas condições de cultivo. Mesmo assim, é possível comparar alguns resultados de um mesmo grupo de pesquisa, como os de Liang et al. (2009), os quais relatam que a produção de biomassa de *Chlorella protothecoides* no cultivo heterotrófico chega a ser 3,4 vezes maior do que no fotoautotrófico.

Outro fator crítico no cultivo heterotrófico, diz respeito à alta densidade e ao suprimento com oxigênio, haja vista que microalgas heterotróficas são aeróbicas e, quanto maior a densidade do cultivo, maior a demanda por oxigênio, o qual é utilizado durante seu metabolismo (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Bumbak et al. (2011) e Perez-Garcia et al. (2011) citam que o suprimento inadequado de oxigênio tende a reduzir a taxa de crescimento específico e a produtividade de biomassa.

A agitação é outro parâmetro importante na produção de microalgas em grandes volumes. No caso do crescimento heterotrófico, a movimentação favorece o intercâmbio gasoso entre células e o meio, evita a sedimentação da biomassa e impede a formação de gradientes das condições de cultivo (CONTRERAS-FLORES et al., 2003), todavia, algumas microalgas são extremamente sensíveis às altas taxas de agitação (CHEN et al., 1997; CAMACHO et al., 2011).

A questão sobre a maior ou menor suscetibilidade à contaminação bacteriana dos sistemas heterotróficos é controversa. Bumbak et al. (2011) considera que esses cultivos são mais propensos à contaminação devido à presença do carbono orgânico. No entanto, por ser um sistema fechado e controlado, muitos consideram que essas contaminações são menores, sendo necessário realizar a esterilização do sistema de produção e analisar o custo-benefício desse processo (CHEN, 1996). Li et al. (2007) esclarecem que o vapor utilizado para esterilização pode corresponder a 14,2% dos custos totais de produção.

Embora existam várias espécies de microalgas heterotróficas, poucas possuem potencial para produção em grande escala (BUMBAK; COOK; ZACHLEDER et al., 2011; PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011). Isso ocorre porque, além da capacidade de oxidar os compostos orgânicos presentes no meio, é desejável que apresentem as características descritas por Day et al. (1991), Bumbak et al. (2011) e Perez-Garcia et al. (2011):

1. Possuir a capacidade de oxidar uma fonte de carbono orgânico não onerosa e, se possível, esterilizável;
2. Adaptar-se rapidamente às condições de cultivo;
3. Apresentar taxas de crescimento específico compatíveis com a produção em grande escala;
4. Apresentar alta taxa de sobrevivência;
5. Possibilidade de ser cultivada em biorreatores convencionais;

6. Resistir ao processo de colheita adotado durante a produção;
7. Ser resistente ao estresse mecânico e químico imposto pelo sistema de aeração e/ou mistura;
8. Não ser tóxica, no caso do produto ser um composto para fins alimentares;
9. Possuir fácil manuseio;
10. Ser robusta, ou seja, não necessitar de condições ou nutrientes muito específicos que possam encarecer o sistema.

Isleten-Hosoglu et al. (2012) descrevem que, em grande escala, o gênero *Chlorella* foi o que apresentou maior potencial para a produção heterotrófica. *Chlorella protothecoides* pode crescer tanto em condições fotoautotróficas, quanto heterotróficas e mixotróficas, sendo bastante promissora para a produção de biodiesel, haja vista que pode apresentar 55% de sua biomassa com lipídeos (MIAO et al., 2011). Wu e Shi (2007) conseguiram concentrações de *C. protothecoides* em cultivo heterotrófico de 116,2 g L⁻¹ e produtividade de 1,02 g L⁻¹ h⁻¹.

4.2.3 Sistemas mixotrófico e fotoheterotrófico

As várias definições para o termo mixotrófico são apresentadas por Chojnacka e Marquez-Rocha (2004). Todavia, ainda não existe um consenso sobre essa terminologia. Entre as definições para o cultivo mixotrófico destacam-se:

- a) São processos metabólicos, nos quais a fotossíntese é a principal fonte de energia. Contudo, tanto os compostos orgânicos quanto o dióxido de carbono são essenciais;
- b) Possuem capacidade para crescer em condições fotoautotróficas e heterotróficas, dependendo da concentração dos carboidratos e da intensidade da luz;

- c) São capazes de assimilar os compostos orgânicos como fonte de carbono e utilizar carbono inorgânico como doador de elétrons;
- d) Captam energia pela catálise de compostos orgânicos e as utilizam para a conversão da energia luminosa em substâncias químicas pela fotossíntese.

O cultivo mixotrófico é considerado aquele em que ocorrem, simultaneamente, as rotas fotoautotróficas, por meio da fotossíntese, e as rotas heterotróficas, com a oxidação de compostos orgânicos externos utilizados na respiração, sendo essa definição utilizada por Yeh e Chang (2012), Wen e Chen (2000), Adolf et al. (2006), Perez-Garcia et al. (2011) e Yeh et al. (2012). Para que as microalgas sejam capazes de crescer em condições mixotróficas, suas enzimas do metabolismo heterotrófico não podem ser inibidas pela presença de luz (PEREZ-GARCIA; ESCALANTE; DE-BASHAN et al., 2011).

A produtividade dos sistemas mixotróficos não corresponde a uma simples soma das duas formas de cultivo (fotoautotrófico e heterotrófico). Isso porque há indícios de que ocorra uma ligação entre o sistema de transporte de elétrons das rotas fotoautotróficas e heterotróficas, tornando-as interdependentes (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Em um sistema mixotrófico ideal, as taxas de respiração e da fotossíntese são correspondentes, não ocorrendo a liberação de gás carbônico ou oxigênio para o meio externo, pois ocorreria um equilíbrio entre o consumo e a produção. Porém, na prática, essa situação não foi observada, pois dependendo da condição metabólica predominante poderá ocorrer um desequilíbrio, principalmente, devido às limitações do sistema. No sistema mixotrófico, tanto a luz quanto a fonte de carbono orgânica são fatores limitantes para o crescimento e ambas podem ser consideradas, em termos de produtividade, substratos (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

No cultivo mixotrófico não foi observada a fotoinibição, fenômeno comum nos fotoautotróficos, devido à alta intensidade luminosa, em geral superior a 20 kLux. A fotoinibição está relacionada à saturação do fotossistema II e pode ocasionar danos reparáveis nas células. Yeh e Chang (2012) salientam que essa capacidade de recuperação varia em função da espécie de microalga e das condições de cultivo.

A ausência da fotoinibição em sistemas mixotróficos possivelmente se deve à presença da glicose ou de outra fonte de carbono orgânico. Outro fator, diz respeito ao deslocamento da intensidade luminosa máxima que poderia provocar essa situação devido à presença da fonte de carbono orgânico. Embora não ocorra fotoinibição no mixotrófico, pode ocorrer inibição, devido ao substrato (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

As microalgas em cultivo mixotrófico, de acordo com Markou e Georgakakis (2011), são menos sensíveis à saturação luminosa e requerem menores intensidades para o seu crescimento. Dessa maneira, caso seja utilizada iluminação artificial, os gastos com esse parâmetro serão menores nesse sistema em comparação com o fotoautotrófico (GARCIA et al., 2005).

Ao testarem o crescimento no cultivo mixotrófico e fotoautotrófico da *Anabaena* utilizando glicose como fonte de carbono, Guoce et al. (2011) observaram que no mixotrófico foi necessária uma intensidade luminosa inferior, mesmo apresentando maior taxa de crescimento, resultando em produtividade de biomassa de 1,5 a 2,0 vezes superior. Todavia, constatou-se que essa microalga não foi capaz de crescer em condições de heterofilia.

Quando são utilizados meios de cultivo provenientes de resíduos, em geral, a turbidez tende a aumentar, desfavorecendo o cultivo apenas fotoautotrófico. No entanto, o crescimento das mixotróficas nesses meios tende a ser melhor (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; PITTMAN et al., 2011).

Ao cultivarem *Chlorella zofingiensis* utilizando resíduos da indústria de azeite de oliva, Córdoba et al. (2008) concluíram que esse meio foi eficaz para a produção de biomassa. Mezzomo

et al. (2010) realizaram um estudo com *Spirulina platensis*, com o objetivo de produzir biomassa e diminuir o potencial poluidor de resíduos provenientes de dejetos suíno. Esses pesquisadores concluíram que este sistema de cultivo mixotrófico foi eficiente para diminuir a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e o teor de fósforo nos efluentes líquidos.

Singh et al. (2011) utilizaram *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus bijuga* no tratamento de resíduos provenientes da produção de frangos e concluíram que essas microalgas se mostraram robustas e capazes de consumir tanto compostos orgânicos como inorgânicos. Destaca-se que esta é uma vantagem das mixotróficas em comparação com as fotoautotróficas, que não conseguem consumir os compostos orgânicos como fonte de carbono.

Além do tipo e da concentração da fonte de carbono, o cultivo mixotrófico é influenciado pela luminosidade, temperatura, microrganismos contaminantes e pH (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Embora o sistema mixotrófico resulte em menor variação do pH, para determinadas microalgas é necessário controlar esse parâmetro com o objetivo de conseguir boa produtividade (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Liang et al. (2009) citam que existem várias microalgas mixotróficas na natureza, mas poucas são capazes de crescer em condições de laboratório, sendo que, entre as que apresentam essa capacidade destacam-se: *Haematococcus pluvialis*, *C. protothecoides*, *Ochromonas mínima* e *Nannochloropsis* sp.

Outra forma de metabolismo que pode estar presente nas microalgas é o fotoheterotrófico; neste, a luz é a fonte de energia e o composto orgânico a fonte de carbono. Na prática, para se identificar se o metabolismo é mixotrófico ou fotoheterotrófico, torna-se necessário determinar quais são os parâmetros limitantes do crescimento das microalgas. No mixotrófico, o crescimento é elevado caso ocorra aumento do carbono orgânico ou da oferta de luz, já no fotoheterotrófico, apenas se ambos os parâmetros forem acrescidos simultaneamente (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Os metabolismos fotoheterotróficos e mixotróficos também podem ser diferenciados no que se refere ao consumo de dióxido de carbono; se não existe consumo desse gás, é fotoheterotrófico. Já no cultivo mixotrófico, devido à fotossíntese, ocorre o consumo de dióxido de carbono (YEH; CHANG, 2012).

Yeh et al. (2012) estudaram o sistema fotoheterotrófico de *Chlorella vulgaris* utilizando diferentes fontes de carbono e observaram que o cultivo contendo glicose apresentou melhores taxas de crescimento. Além disso, o acetato mostrou-se como fonte potencial, pois o custo da glicose é muito elevado.

4.3 Cultivos Monoalgáceos e Mistos

Em relação à quantidade de espécies de microalgas em um cultivo, esses podem ser classificados em monoalgáceos ou mistos. O primeiro refere-se a uma cultura de uma única espécie, sendo amplamente utilizado na pesquisa, manutenção de cepas e produção comercial, pois proporciona maior controle do processo de crescimento e de produção da biomassa. O misto envolve, em uma mesma unidade, duas ou mais microalgas. Contudo, pode ocorrer a dominância de certas espécies, que inibem outras, o que pode influenciar a produção (LOURENÇO, 2006). Os cultivos mistos são eficientes quando utilizados em tratamentos de efluentes líquidos, nos quais cada uma das microalgas cultivadas pode ser mais eficiente na remoção de um poluente específico (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

4.4 Condições Hidráulicas de Cultivo

Os sistemas de cultivo de microalgas, caracterizados como descontínuos, semicontínuos e contínuos estão relacionados à forma de se produzir biomassa e pelas condições hidráulicas impostas.

O cultivo descontínuo é conhecido como “batelada” ou estanque; nele, as células são inoculadas em meio de cultura e nenhum outro componente é adicionado ao longo de seu desenvolvimento, assim como, também, não ocorre a retirada da biomassa, apenas a de alíquotas para controle do processo. Suas principais vantagens são as facilidades de operação e as menores chances de contaminação. Entre as desvantagens, destaca-se o fato de não possibilitar produção contínua e de não minimizar o efeito inibidor que as altas concentrações iniciais de nutrientes possam ocasionar nas microalgas (CARVALHO et al., 2001).

Uma variação desse sistema estanque é o descontínuo alimentado, também conhecido como “batelada” alimentada, no qual um ou mais nutrientes são adicionados aos poucos nos fotobiorreatores, cujo objetivo é diminuir a ocorrência de inibição por substrato, pois no método tradicional a concentração inicial dos nutrientes tende a ser muito alta, uma vez que a mesma deve suprir o crescimento microbiano até o final (CARVALHO; SATO, 2001).

Diante do exposto, Siegler et al. (2011) salientam que o heterotrófico tem apresentado melhores resultados quando comparado ao descontínuo. Xiong et al. (2008) avaliaram estratégias para alimentar a cultura de *Chlorella prothotecooides* em sistema heterotrófico e constataram que a densidade subiu de $3,2 \text{ g L}^{-1}$ para $51,2 \text{ g L}^{-1}$ quando o sistema passou de estanque para “batelada” alimentada, o que demonstra uma forte influência desse sistema operacional sobre a produtividade. Matsudo (2006) estudou a produção fotoautotrófica em regime de “batelada” alimentada de *Spirulina platensis* utilizando como fonte de nitrogênio a ureia, que apesar de barata, pode ser tóxica para as microalgas. Esse cultivo resultou numa produtividade de $219,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, considerado bom para a espécie.

No regime semicontínuo, tanto o inóculo como o meio de cultivo são adicionados em conjunto nos fotobiorreatores,

sendo que após atingir a fase estacionária ou quando a produtividade de biomassa iniciar sua redução, uma parcela das unidades é removida e substituída por uma cultura nova, sem células. A remoção das frações do cultivo envolve a interrupção da aeração, agitação do sistema e a parcela que permanece no interior dos fotobiorreatores serve como inóculo para a produção seguinte (BORZANI et al., 2001).

Essas características do sistema semicontínuo viabilizam o cultivo de microalgas, principalmente em grande escala. No entanto, é importante observar que são necessários estudos para se determinar qual a melhor porcentagem a ser retirada, bem como em qual momento deve ser realizada. Hulatt e Thomas (2011), ao cultivarem *Scenedesmus obliquus* durante seis meses em fotobiorreator fechado, sem controle de temperatura e com sistema semicontínuo, alcançaram resultados expressivos de produtividade, resultando em valores de $26,67 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

Nas condições de fluxo contínuo, a entrada do meio de cultura e a saída das microalgas é permanente, caracterizando um regime balanceado, conduzido 24 horas por dia, no qual o volume em operação permanece constante. Esse sistema permite produção contínua e minimiza tanto os efeitos inibidores da concentração inicial dos nutrientes quanto a inibição resultante dos produtos do metabolismo dos próprios microrganismos. Todavia, apresenta como desvantagens a dificuldade operacional e a maior possibilidade de contaminação (FACCIOTTI, 2001).

O sistema contínuo exige maior conhecimento da cinética de crescimento das microalgas, a fim de se determinar a taxa de diluição para que o cultivo permaneça na fase desejada, geralmente início da estacionária. Ao utilizarem um sistema contínuo, Briassoulis et al. (2010) alcançaram os melhores resultados (produtividade máxima de biomassa de $3,03 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para o fotoautotrófico de *Nannochloropsis* sp.

4.5 Microalgas em Fotobiorreatores

As alternativas mais comuns para a produção fotoautotrófica de biomassa a partir das microalgas são classificadas, de acordo com suas características físicas, como sistemas abertos e fechados. A seguir é apresentada a composição desses sistemas.

4.5.1 Fotobiorreatores abertos

Os sistemas abertos, conforme citado por Lourenço (2006), apresentam variações em suas dimensões e são chamados genericamente de tanques de recirculação. Além disso, ainda segundo o autor, são encontrados em diversas formas e funcionamento, como em caixas de água, piscinas rasas em formato circular ou elíptica, além dos diferentes métodos de agitação para mistura envolvida.

Em geral, os sistemas de grande porte devem ser abertos, pois permitem a produção de biomassa em grandes quantidades e com menor custo, com pequena profundidade, de 15 cm a 20 cm, visando assegurar adequada incidência de luz solar no meio de cultivo (PULZ, 2001). Uma unidade tipo pista de corrida, conhecida como *raceway*, é composta de uma volta fechada de um canal de recirculação, na qual as pás rotativas operam todo o tempo, para prevenir sedimentação e promover a manutenção das condições do fluxo hidráulico (CHISTI, 2007b).

Essas unidades podem ser construídas em concreto e alvenaria. Todavia, devem ser revestida por uma superfície lisa, a fim de reduzir o atrito das células com as paredes, bem como facilitar a limpeza. O acabamento interno pode ser com plástico, fibra de vidro, vinil atóxico ou PVC. O revestimento interno deve ser de cores claras, permitindo maior reflexão da luz (LOURENÇO, 2006; BERTOLDI et al., 2008).

Os cultivos em grande escala envolvem também o consumo de enormes volumes de água de boa qualidade, a qual

deve possuir um registro de análises dos nutrientes nela presentes, balizados em parâmetros físicos, químicos e biológicos, os quais podem ser seguidos de acordo com a Resolução do nº. 357 do CONAMA, que classifica padrões de qualidade (BRASIL, 2005). Essa caracterização das águas possibilitará a adequada aplicação dos nutrientes e, com isso, a redução de gastos pela diminuição dos componentes utilizados para o enriquecimento da cultura.

A dissolução dos diferentes tipos de sais que serão aplicados nos meios de cultura deverá ser realizada de forma cuidadosa, sendo que cada componente deverá ser adicionado individualmente, nunca misturado com outros constituintes. Além disso, a adição sequencial de um sal ao meio só pode ser realizada após a dissolução total do primeiro elemento aplicado. O mesmo cuidado deve ser tomado para os demais sais adicionados.

A agitação é um modo particular de mistura, portanto, uma movimentação do material líquido contido em um recipiente. Os cultivos de microalgas em grande escala envolvem a agitação e/ou aeração, sendo esses úteis para promover a dissolução e a mistura dos constituintes no meio de cultura, os quais podem ser mantidos em operação durante sua adição e preparação.

Nos tanques de pequeno porte, a simples introdução do ar em pequenas bolhas pode promover a agitação adequada. A intensidade da agitação deve ser moderada, para não promover danos às células. A distribuição do ar nos tanques de recirculação pode ser feita por tubos de PVC ou mangueiras com furos, as quais deverão ser dispostas em locais previamente determinados, visando o melhor desempenho na dissolução dos gases. A aeração pode envolver também a adição de CO_2 , fornecido por cilindros de gás, cuja vazão deve ser controlada por manômetros. A vazão do gás pode variar de 1% a 10%, de forma contínua ou alternada. Contudo, o excesso de CO_2 também pode ocasionar a acidificação do meio de cultivo.

Em tanques de recirculação de grande porte, a agitação pode ser realizada com pás rotativas, as quais promovem uma

mistura hidráulica associada ao desenho das unidades. A instalação das pás é de baixo custo e permite o controle da velocidade e da direção do fluxo do meio de cultivo. Além disso, a movimentação horizontal criada pelas pás proporciona bons resultados no que se refere à homogeneização das microalgas nas unidades (LOURENÇO, 2006). O número de pás que compõem o sistema rotacional em um mesmo ponto do eixo, onde estão fixadas, pode chegar a oito, dependendo das dimensões dos tanques. O posicionamento das pás nas unidades poderá ser em uma depressão do tanque, permitindo, assim, maior efeito no fluxo. Entretanto, a utilização de pás não alinhadas também pode promover o mesmo efeito.

O tamanho das pás rotativas pode variar em função do seu diâmetro. Pás de grande porte produzem forças de fricção menores do que as de pequenas dimensões, haja vista que, estas devem girar mais vezes por unidade de tempo para produzir o mesmo efeito. Essas diferenças podem acarretar danos mecânicos nas células, além de contribuir para a formação de espumas e coloides junto às áreas de contato. Segundo Lourenço (2006), a definição da velocidade de rotação está relacionada com a área e a profundidade do tanque de recirculação, bem como com as características das microalgas (sensibilidade à agitação e tamanho celular). A adequada turbulência promove uma boa homogeneização do meio, possibilitando, assim, a exposição adequada das microalgas à luz, bem como a dispersão dos gases e homogeneidade do sistema.

Entretanto, para análise do desempenho da agitação mecânica devem ser consideradas algumas variáveis como: tipo, forma e quantidade de pás rotativas, bem como a formação de vórtices, a velocidade de rotação, a concentração e a densidade da mistura, a granulometria das partículas e a velocidade de sedimentação. A configuração do tanque com fundo arredondado facilita também o fluxo, pois a potência consumida na agitação tende a ser reduzida. Além disso, ocorre a redução da formação das chamadas zonas mortas, entre o fundo e as paredes dos tanques de recirculação.

Os defletores são elementos utilizados para evitar a formação de vórtices que ocorrem, geralmente, em líquidos de baixa viscosidade com agitação central. Tal fenômeno é produzido pela ação da força centrífuga que age no líquido em rotação, causada pelo componente tangencial da velocidade do fluido. Os defletores agem, então, interceptando os componentes do escoamento, sem interferir no fluxo axial e radial, sendo que sua montagem pode variar quanto à sua disposição, tamanho, quantidade e o espaçamento entre eles (LIMA, 2005).

Um aspecto que deve ser levado em consideração nos sistemas abertos refere-se às chuvas, haja vista que, em excesso, podem diluir o meio de cultura e/ou transbordar o líquido dos tanques, afetando o desenvolvimento dos cultivos. Assim, é recomendada a instalação de coberturas transparentes, as quais possibilitam a passagem da luz, de maneira a não afetar o processo de fotossíntese.

As desvantagens dos fotobiorreatores abertos relacionam-se à contaminação por outras espécies de microalgas e microrganismos, os quais podem contribuir para a baixa produtividade da biomassa. Além disso, existem outras situações como a evaporação das águas aliada às dificuldades de controlar algumas variáveis do processo como pH, temperatura e CO_2 (PULZ, 2001).

O potencial hidrogeniônico (pH), que indica a condição de acidez, neutralidade e alcalinidade das águas, é um fator crítico e seu controle é muito importante para o sucesso do cultivo. A faixa de pH em que se pode alcançar a melhor densidade algácea encontra-se dentro dos limites de 7,5 e 9,0. No entanto, quando ocorre o consumo do CO_2 durante o dia pela fotossíntese, o pH pode elevar, mas, por outro lado, a liberação e dissolução do gás carbônico no meio pela respiração promovem a redução do pH (EMBRAPA, 2000).

Nos locais de clima temperado e subtropical, essas unidades deverão permanecer cobertas, a fim de evitar variações

bruscas de temperatura, principalmente durante o inverno, de maneira a impedir o congelamento das camadas superficiais do meio de cultivo durante a noite. Como alternativa para se conseguir um bom aproveitamento da biomassa das microalgas, destaca-se o uso de estufas, que podem fornecer um ambiente ideal para a produção durante todo o ano.

Nas regiões tropicais, a temperatura tende a ser alta, assim como a irradiância. O excesso de luz pode causar a fotoinibição e a morte celular se o sistema for inerte, pois estas permanecerão por muito tempo nas camadas superficiais. Entre as formas para controlar a elevação da temperatura, Lourenço (2006) salienta a utilização de água fria circulante em sistemas ao ar livre. Nos ambientes fechados, essa situação pode ser controlada com a refrigeração do local.

Para o cultivo das microalgas, torna-se importante, também, a instalação de sensores em pontos específicos, os quais permitam a avaliação eficiente da produtividade, promovendo o controle e o monitoramento das principais variáveis do processo, bem como das características desejadas da biomassa, lipídeos e pigmentos (LOURENÇO, 2006).

A implantação de sensores automáticos para o monitoramento de sistemas de produção de microalgas requer o desenvolvimento de um elemento de medição contínuo, ou seja, equipamentos que determinem a concentração do cultivo. Os dispositivos existentes no mercado, tais como fluorímetros, espectrofotômetros e contadores de partículas, possuem elevado custo e, na maioria dos casos, realizam essa medição através de amostras previamente coletadas, o que dificulta o controle em sistemas em grande escala. Devido a isso, é de extrema importância o desenvolvimento de técnicas e métodos que viabilizem as aplicações de controle.

Espinosa e colaboradores (1996) relatam que estão sendo utilizados sensores físico-químicos tradicionais para a medição e controle do pH, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono, potencial de oxidação e condutividade elétrica.

A coleta das microalgas, geralmente, é realizada no lado oposto do sistema de entrada dos nutrientes, através de coletores, que quantificam o material extraído. Para isso, devem ser instalados equipamentos que registram continuamente os volumes coletados das unidades, sendo que os volumes das descargas deverão ser previamente detalhados em cada fase do projeto. No cultivo em unidades abertas de *Muriellopsis sp.*, Blanco et al. (2007) utilizaram o regime semicontínuo, sendo que as frações de coleta eram realizadas no período da manhã e baseadas na estimativa da densidade de células, com posterior adição de um meio novo.

4.5.2 Fotobiorreatores fechados

Com a utilização das microalgas para a preparação de produtos de alto valor agregado como cosméticos e fármacos, passou a haver viabilidade na produção de biomassa algal em fotobiorreatores fechados (RICHMOND et al., 1993). Além disso, diante dos principais inconvenientes do cultivo aberto como a evaporação, a difusão de CO₂ para a atmosfera e a ameaça permanente da contaminação, a utilização de unidades de cultivo abertas passou a ser questionadas.

Os fotobiorreatores de configuração fechada se caracterizam por promoverem maior crescimento das microalgas, além de favorecerem o controle de alguns parâmetros que devem ser monitorados, como as condições de fluxo, a temperatura e a intensidade luminosa, em função do desenho técnico, quando da sua elaboração (PULZ, 2001; FRANCISCO, 2010; READELLI et al., 2010; SOARES, 2010; HOLANDA; RAMOS; MEDEIROS et al., 2011).

Dentre as principais vantagens desse sistema, podem ser destacadas as menores perdas de água por evaporação, a redução dos problemas relacionados à contaminação por outros microrganismos, a maior facilidade nos procedimentos de coleta de biomassa, pois se concentra em menores volumes

de meio de cultura, a menor necessidade de espaço devido ao volume, ao maior rendimento por unidade de área e volume, a maior facilidade para reaproveitar o meio de cultura parcialmente consumido e a possibilidade de obter cultivos com alto grau de pureza (LOURENÇO, 2006; GRIS, 2011).

Entre as diversas configurações dos sistemas fechados, Frac et al., (2010) destacam três tipos de fotobiorreatores: coluna vertical, cilíndrico e em placas. A forma cilíndrica corresponde à grande maioria, variando no tamanho, comprimento e na disposição vertical ou horizontal dos tubos, além dos tipos de materiais transparentes utilizados, como plástico, acrílico, vidro ou policarbonato, para permitir a penetração de luz. Novas formas achatadas com placas foram idealizadas, buscando uma forma mais eficaz para o incremento da incidência da luz e, com isso, o aumento da produtividade. No entanto, verificou-se que existem problemas que incluem o superaquecimento, o entupimento, a acumulação de oxigênio, o alto custo de instalação, a operação e a manutenção do cultivo (PEQUENO, 2010).

Em todos os casos, para uma boa produtividade, um dos principais fatores é a turbulência, fundamental para o sucesso do projeto (TREDICI, 1999). O modelo cilíndrico apresenta como vantagens o baixo custo, a troca de massa e calor satisfatórios, cultura relativamente homogênea, liberação eficiente de O_2 e gás residual, sendo que sua altura deve ser duas vezes superior ao seu diâmetro. Para isso, deverão possuir em sua base difusores, os quais convertem o gás injetado em pequenas bolhas, favorecendo a transferência de CO_2 e a remoção de O_2 durante a fotossíntese (SINGH et al., 2012). Os fotobiorreatores construídos em placas apresentam a forma cúbica, de modo que a luz percorra um caminho mínimo e, caracterizam-se pela elevada relação entre área e volume (SINGH e SHARMA, 2012).

Nos cultivos fechados, os custos de ajuste e operação são mais elevados quando comparados aos abertos, mas a eficiência e o rendimento em biomassa são significativamente supe-

riores, ou seja, essa desvantagem inicial nos investimentos é dissipada no médio e longo prazo, viabilizando a produção comercial de produtos de alto valor agregado (PÉREZ, 2007). A injeção do ar nos cultivos em grande escala promove uma difusão efetiva dos nutrientes e o aporte parcial do CO₂ inorgânico, proporcionando a estabilidade do pH e a manutenção das algas em suspensão, possibilitando um cultivo uniformemente distribuído, além de contribuírem no processo da fotossíntese.

Uma importante diferença na produção nesse sistema é a exposição da cultura ao ambiente, pois podem ser instalados ao ar livre ou em ambientes cobertos. No caso de cultivos em locais abertos, a luz solar é aproveitada como fonte de energia no crescimento das microalgas. Nos locais fechados, existe a possibilidade do uso de casas de vegetação, cujo teto e paredes laterais são transparentes, permitindo o aproveitamento da radiação solar, que pode ser, ou não, auxiliada pela ação de iluminação artificial (LOURENÇO, 2006). Holanda e colaboradores (2011) constataram que, em muitas unidades, o piso é pintado da cor branca, para aumentar a refletância da luz incidente.

Os sistemas de produção híbrida combinam o cultivo aberto com os fechados em dois estágios distintos. No primeiro, as microalgas crescem num ambiente controlado em unidades fechadas, evitando a contaminação e favorecendo a divisão celular. O segundo estágio expõe as células a estresse nutricional ao movê-las do cultivo fechado para o aberto, o que geralmente desvia o metabolismo para a produção de lipídeos.

4.6 Limpeza e Esterilização dos Sistemas

A contaminação das culturas das microalgas pode ser biológica ou química. Segundo Lourenço (2006), isso pode ocorrer durante as operações de inoculação de uma espécie, na introdução de meio de cultivo, incluindo a reciclagem, a qual deve passar por um processo de esterilização.

A limpeza dos fotobiorreatores pode ser feita através do enchimento total das unidades com água, aliada à aplicação da solução de hipoclorito de sódio (2,5%). Após um período de 10 minutos deverão ser adicionados 2,5 ml de tiosulfato de sódio, na concentração de 250 mg L⁻¹, para realizar a neutralização do cloro. Essa solução permanecerá nas unidades durante por 24 horas, sendo, posteriormente, descartada para a realização de lavagem com água corrente.

4.7 Viabilidade Econômica da Produção

A viabilidade econômica de um sistema de produção de microalgas está vinculada, principalmente, aos investimentos necessários para sua instalação e operação, bem como ao valor agregado do produto final. Dessa maneira, é essencial considerar que há diferentes produtos que podem ser obtidos a partir desse cultivo, alguns com alto valor agregado, como pigmentos e óleos poli-insaturados, enquanto outros apresentam baixo valor agregado, como o biodiesel. Além disso, a produção de microalgas pode não estar relacionada diretamente à obtenção de um produto, mas a um processo, como a fixação de gás carbônico e/ou a diminuição do potencial poluidor de um resíduo.

O Departamento de Energia dos Estados Unidos desenvolveu por quatro décadas um programa de pesquisa sobre microalgas, com foco principalmente no mecanismo fotoautotrófico. Baseados nos resultados desse programa, Davis et al. (2011) realizaram uma análise tecno-econômica sobre a produção fotoautotrófica de microalgas para produção de biodiesel. Para isso, foi considerada uma taxa de retorno de 10%, concluindo-se que o biodiesel de microalgas provenientes de fotobiorreatores fechados custaria U\$ 20,53 o galão, enquanto no precedente de um sistema aberto o valor seria de U\$ 9,84. Em ambos os casos, os maiores custos estão relacionados à instalação do processo de cultivo. Apesar de ser mais barato, o

sistema aberto ainda não é competitivo com diesel comum, cujo galão custava, no período, cerca de U\$ 2,60.

Razon e Tan (2011) ao estudarem o retorno energético das microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis* sp. em fotobiorreatores fechados, massivo e em sistemas abertos, concluíram que ambas tiveram retorno negativo. Os principais pontos que levaram a esses resultados foram a utilização de um fotobiorreator para produção de inóculo e sistemas de extração que necessitavam de secagem da biomassa, pois o consumo de energia nessas etapas foi muito alto. Assim, os autores indicaram como alternativas para a viabilização: a comercialização de coprodutos para agregar valor ao processo, a pesquisa de microalgas mais produtivas, a retirada do fotobiorreator fechado do processo e o desenvolvimento de novos métodos de extração.

Além do aproveitamento de coprodutos, a viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir do sistema fotoautotrófico pode evoluir ao se considerar o retorno financeiro relativo à fixação de gás carbônico, a produção conjunta de outros compostos energéticos, principalmente biogás e bioetanol. Harun et al. (2011) estudaram o cultivo fotoautotrófico para produção de biodiesel, bioetanol e biogás, e observaram que os melhores resultados ocorreram quando se utilizaram os lipídeos para produção de biodiesel e as demais porções da biomassa para produção de biogás. Entre as vantagens de só produzir biogás é que não é necessário secar a biomassa, nem fazer esterificação, processos que consomem muita energia. Relata-se ainda que o cultivo aberto para produção de compostos combustíveis foi o mais indicado.

Em uma relação entre o cultivo heterotrófico e o mixotrófico das microalgas para a produção de biocombustíveis, Shen et al. (2010) salientam que ainda existem poucos estudos para compará-los com o fotoautotrófico, bem como à produção de etanol por levedura. No entanto, o cultivo de microalgas

heterotróficas poderia ser acoplado à produção de etanol por leveduras, porque ambos os processos usam matérias-primas semelhantes. Destaca-se que a taxa de utilização do açúcar pelas microalgas pode ser superior ao das leveduras. Além disso, estas podem utilizar uma faixa mais ampla de compostos orgânicos, como fonte de carbono.

Bumbak et al. (2011) consideram que o cultivo heterotrófico de microalgas seria viável apenas para produtos que não são obtidos de outros microrganismos, os quais já estariam mais adaptados a grandes escalas de produção. No entanto, Xiong et al. (2008) consideram que o sistema heterotrófico com densidade de $116,2 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade de $10,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ já seriam competitivos com o etanol. Destaca-se que a comparação do heterotrófico é geralmente feita com base no etanol obtido a partir de leveduras, porque este também apresenta dependência em relação a uma fonte externa de carbono orgânico.

Para as microalgas em sistema heterotrófico, Li et al. (2007) estimam que a glicose corresponde a 45,4% do custo global da produção. Embora a glicose sustente as melhores produções de biomassa, dependendo do valor agregado do produto final é essencial pesquisar alternativas para essa fonte. Dessa maneira, várias pesquisas têm sido realizadas a fim de encontrar fontes alternativas e, com isso, contribuir para a viabilidade financeira da produção de microalgas (SHEN; YUAN; PEI et al., 2010).

O uso de águas residuárias tem sido avaliado como base para o meio de cultivo heterotrófico de microalgas. Em geral, esses sistemas têm como foco principal o tratamento de efluentes, sendo que a biomassa gerada é um subproduto do processo. Embora não produzam tanto quanto o meio à base de glicose, esses meios de cultivo podem ser promissores, principalmente para a produção de compostos de baixo valor agregado, como o biodiesel. Além disso, como ocorre redução do potencial de poluição dos resíduos utilizados, agrega-se valor ao passivo ambiental.

Independentemente do sistema adotado, a produção em grande escala de microalgas deve ser considerada como uma tecnologia emergente e, como tal, ainda deverão ser realizados estudos para torná-la competitiva com os demais sistemas de produção de biocombustíveis.

Considerações Finais

A produção de microalgas em fotobiorreatores abertos e/ou fechados depende da composição dos nutrientes, da geometria e forma das unidades e dos custos envolvidos. Além disso, estão sujeitos às condições hidráulicas impostas ao sistema de cultivo, os quais se diferenciam pelo fluxo de entrada de meios de cultivo e saída de produtos, destacando-se os contínuos, os descontínuos e os semicontínuos, que influenciam nos padrões de produção da biomassa.

O sistema mais comum e tradicional utilizado para a produção desses microrganismos é o fotoautotrófico, que se baseia no metabolismo fotossintetizante e, portanto, luz e gás carbônico são necessários para que ocorra a produção de biomassa. Entre os diversos insumos necessários, a água exerce papel fundamental no processo produtivo, pois o conhecimento de suas características físicas e químicas possibilita a adequada utilização dos nutrientes, os quais refletem no consumo de grandes quantidades, quando relacionadas às escalas de produção.

Na avaliação do desenvolvimento de microalgas, é necessário o acompanhamento do crescimento da cultura por meio de alíquotas, visando a determinação do momento ótimo da coleta de biomassa, a qual está relacionada à densidade das células. Para isso, torna-se necessário a elaboração de um procedimento operacional, cujo objetivo, refere-se ao controle das condições de cultivo, resultando em um processo mais fácil e seguro de ser controlado.

O cultivo de microalgas pode ter diferentes objetivos, como: produção de biodiesel, pigmentos, proteínas, fixação de gás carbônico ou diminuição do potencial poluidor de efluentes.

Referências

ADOLF, J. E.; STOECKER, D. K.; LAWRENCE JR., W. H. The balance of autotrophy and heterotrophy during mixotrophic growth of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae). **Journal of Plankton Research**, New York, v. 28, n. 8, p. 737-751, 2006.

AZMA, M. et al. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 53, p. 187-195, 2011.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BLANCO, A. M. et al. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. In open ponds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 73, n. 6, p. 1259-1266, 2007.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 1. 254 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005**. Brasília, 2005. 23 p.

BRIASSOULIS, D. et al. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 17, p. 6768-6777, 2010.

BRUTEMARK, A.; GRANÉLI, E. Role of mixotrophy and light for growth and survival of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum*. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 388-394, 2011.

BUMBAK, F. et al. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, n. 1, p. 31-46, 2011.

CAMACHO, F. G. et al. Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga. **Process Biochemistry**, Barking, v. 46, n. 4, p. 936-944, 2011.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 22, n. 6, p. 1490-1506, 2006.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 193-204.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 14, n. 11, p. 421-426, 1996.

CHEN, F.; CHEN, H. ; GONG, X. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus laevis* and rheological behaviour of the cell suspensions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 62, p. 19-24, 1997.

CHENG, Y.-L. et al. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 82-87, 2011.

CHENG, Y. et al. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 777-781, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

CONTRERAS-FLORES, C.; PENA-CASTRO, J. M.; FLORES-COTERA, L. B. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. **Interciencia**, Caracas, v. 28, n. 8, 2003.

CÓRDOBA, L. T. et al. Batch culture growth of *Chlorella zofingiensis* on effluent derived from two-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 11, n. 2, p. 12-19, 2008.

DAVIS, R.; ADEN, A.; PIENKOS, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 10 p. 3524-3531, 2011.

DAY, J. D.; EDWARDS, A. P.; RODGERS, G. A. Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of a microalgal mollusc feed. **Bioresource Technology**, Essex, v. 38, n. 2-3, p. 245-249, 1991.

DE LA HOZ SIEGLER, H. et al. dynamics of heterotrophic algal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 10, p. 5764-5774, 2011.

EMBRAPA. **Parâmetros ambientais e qualidade da água na piscicultura**. Brasília, 2000. (Recomendações Técnicas, v. 8).

ESPINOSA, M. C. et al. **Empleo de indices de geoquimicos en el establecimiento del monitoreo de cultivos de microalgas**. Ciudad de La Habana: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1996. 6 p.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: BORZANI, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2, p. 223-246

FRAC, M.; JEZIERSKA-TYS, S.; TYS, J. Microalgae for biofuels production and environmental applications: a review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, p. 9227-9236, 2010.

FRANCISCO, E. C. **Biofixação de dióxido de carbono por microalgas acumuladoras de materiais graxos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual Campinas, Campinas, 2010.

GARCIA, M. C. C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, Barking, v. 40, n. 1, p. 297-305, 2005.

GRIS, L. R. S. **Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator airlift**. Porto Alegre: UFRGS, 2011. 148 p.

GUOCE, Y. et al. Growth and physiological features of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in a Glucose-Mixotrophic Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 19, n. 1, p. 108-115, 2011.

HALLMAN, A.; SUMPER, M. The *Chlorella* hexose/H⁺ symporter is a useful selectable marker and biochemical reagent when expressed in *Volvox*. **Proceedings of the National Academic of Science**, Washington, v. 93, p. 669-673, 1996.

- HARUN, R.; DAVIDSON, M.; DOYLE, M.; GOPIRAJ, R.; DANQUAH, M.; FORDE, G. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, p. 741-747, 2011.
- HOLANDA, L. R. et al. **O cultivo de microalgas para a geração de eletricidade**. In: VII CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO. 2011. Disponível em: http://www.excelenciaemgestao.org/Portals/2/documents/cneg7/anais/T11_0355_1625.pdf. Acesso em: 17 fev. 2014.
- HULATT, C. J.; THOMAS, D. N. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 10, p. 5775-5787, 2011.
- ISLETEN-HOSOGLU, M.; GULTPE, I.; ELIBOL, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 61, p. 11-19, 2012.
- JEONG, H. J. et al. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. **Ocean Science Journal**, Seoul, v. 45, n. 2, p. 65-91, 2010.
- JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 4, p. 1406-1413, 2010.
- KOWALSKI, S. C. **Análise da viabilidade técnica econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel estudo de caso Paranaguá – Estado do Paraná**. 92 p. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Meio Ambiente) - Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, Curitiba, 2012.
- Li, X.; Xu, H.; Wu, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2007.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.

LIMA, L. B. **Monitoramento on-line de um agitador**. Ouro Preto, MG: UFOP, 2005. 76 p.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, Barking, v. 88, p. 3389, 2011.

MATSUDO, M. C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando ureia como fonte de nitrogênio**. São Paulo: USP, 2006.

MEZZOMO, N. et al. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 6, p. 841-846, 2006.

MORAIS, M. G. D.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1038-1042, 2008.

MULITERNO, A. et al. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

OGBONNA, J. C.; MASUI, H.; TANAKA, H. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, p. 359-366, 1997.

PEQUENO, M. A. G. **Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa**. João Pessoa: UFPA, 2010. 65 p.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PÉREZ, H. E. B. **Biodiesel de microalgas**. São Paulo: IPEN, 2007. p. 1-19.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2011.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 287-293, 2001.

RAZON, L. F.; TAN, R. R. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. **Applied Energy, Barking**, v. 88, p. 3507-3514, 2011.

READELLI, C.; MARCILIO, N.; RECH, R. **Absorção de gás carbônico por microalgas em fotobiorreatores**. 2010. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/31969/000784030.pdf?sequence=1>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on growth, chemical and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in bath cultures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, p. 195-214, 2002.

RICHMOND, A. et al. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 5, n. 3, p. 327-332, 1993.

SHEN, Y. et al. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 160, p. 1674-1684, 2010.

SHI, X. M. et al. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. **Process Biochemistry**, Barking, v. 34, p. 341-347, 1999.

SHI, X. M.; ZHANG, X. W.; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, p. 312-318, 2000.

SINGH, M.; REYNOLDS, D. L.; DAS, K. C. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 23, p. 10841-10848, 2011.

SINGH, R. N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 2347-2353, 2012.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo.** Curitiba: UFPR, 2010.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel.** Maringá: CESUMAR, 2006.

TEIXEIRA, C. M. L. L. et al. **Um novo sistema de cultivo de microalgas para a produção de biodiesel.** Aracaju: ABPG, 2008.

TREDICI, M. R. Bioreactors: photo. In: Sw, D. (Ed.). **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation.** New York: Editor, 1999. v. 1, p. 395-419.

VONSHAK, A. (Ed.) **Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology.** London: Taylor & Francis, 1997. 233 p.

WEN, Z.; CHEN, F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 727-733, 2000.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Applied Microbiology**, Washington, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2007.

XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 78, n. 1, p. 29-36, 2008.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 87-102, 2000.

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**, Essex, v. 105, n. 0, p. 120-127, 2012.

CAPÍTULO 5

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

Helder Rodrigues da Silva
Diva Souza Andrade
Arnaldo Colozzi Filho
Carmen Luísa Barbosa Guedes

Introdução

Nos cultivos de microalgas, os ambientes são sistemas aquosos, consistindo de nutrientes, geralmente, com agitação para aeração com ou sem injeção de CO₂ para aumentar a produção de biomassa, de acordo com o grupo metabólico, por exemplo, autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico.

Os grandes desafios para o desenvolvimento biotecnológico e a comercialização das microalgas são o alto custo da colheita e a secagem/desidratação da biomassa, principalmente em cultivos destinados à produção de biocombustíveis (BOROWITZKA, 1992; SING et al., 2013), mas também para uso como alimento nas incubadoras de aquicultura e outros (BOSMA et al., 2003; BRIASSOULIS; PANAGAKIS; CHIONIDIS et al., 2010). Em pequena escala, a colheita não representa entraves ao sistema produtivo de microalgas, em contraste, no cultivo em grande escala, com volumes acima de 10.000 L, essa etapa é um dos aspectos mais importantes, pois contribui significativamente para a composição do custo total de produção, de acordo com a finalidade da biomassa.

A colheita das células de microalgas é uma etapa que pode alcançar cerca de 20-30% do custo total de produção da biomassa (MOLINA GRIMA et al., 2004; SING; ISDEPSKY; BOROWITZKA et al., 2013) e, em um estudo de caso, o cálculo econômico mostrou que a colheita representa 60% do custo total para produção de ácido eicosapentaenoico (MOLINA GRIMA et al., 2003a). Assim, neste capítulo, a revisão dos trabalhos será com enfoque nos processos e procedimentos envolvidos na colheita e na desidratação da biomassa, visando a sua conservação e a qualidade dos coprodutos processados. Serão descritos também neste capítulo os processos de pré-tratamento, tais como, coagulação/floculação química, física e biofloculação, que são efetivos e práticos para a concentração de células e, com isso, facilitam a remoção do meio líquido de cultivo após a suspensão ou sedimentação da fração sólida. Christenson e colaboradores

(2011), revisando a produção e a colheita de microalgas para tratamento de águas residuárias, biocombustíveis e bioprodutos, apresentaram um panorama das metodologias utilizadas nas diversas indústrias de produção de microalgas.

Neste capítulo, os métodos de colheita em escala industrial não serão discutidos, uma vez que a maioria das empresas não divulgam informações sobre as unidades de produção ou procedimentos da produção de microalgas para geração de matéria-prima para biocombustível e/ou coprodutos.

5.1 Pré-etapas da Concentração/Recuperação das Células de Microalgas

O conceito de colheita de biomassa de microalgas compreende a concentração e a separação das fases sólido-líquido dos cultivos, sendo a parte sólida composta de células algais e a líquida a que contém os nutrientes remanescentes. A colheita de microalgas requer uma ou mais etapas, envolvendo processos físicos, químicos ou biológicos e a etapa principal pode ser executada por centrifugação, filtração, flotação e, em alguns casos, sedimentação por gravidade que, podem ser precedidas pelo pré-tratamento das células como, por exemplo, floculação/coagulação (MOLINA GRIMA; BELARBI; ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2003a; MATA et al., 2010; CHRISTENSON; SIMS, 2011). O processo para concentrar a biomassa dos cultivos de microalgas consiste no pré-tratamento das células por coagulação/floculação seguido de flotação ou sedimentação/decantação da biomassa para a separação da fração líquida/sólida, sendo que em vários trabalhos têm sido reportadas alternativas para superar as dificuldades nessas etapas da colheita (POELMAN et al., 1997; OH et al., 2001; DIVAKARAN et al., 2002; LI et al., 2007; LIAN et al., 2008; HARITH; ZUHARLIDA TUAN et al., 2009; LEE et al., 2009; MAGESH et al., 2009; DE GODOS et al., 2010;

JANČULA et al., 2011; FERRIOLS et al., 2012; LIU et al., 2013; MANDAL et al., 2013). Em todos esses processos, a retirada da parte líquida consome energia e tem um custo alto, dependendo do sistema de cultivo, do volume e da técnica utilizada.

Embora, o processo de colheita das culturas de microalgas seja fator de grande importância, que pode influenciar o custo da produção e a qualidade dos produtos finais, ainda não existe um método de colheita reconhecido como melhor ou mais adequado em termos econômicos e sustentáveis. Isso torna esse assunto bastante pesquisado, com possibilidades de desenvolvimento de um sistema de colheita para a maioria das espécies de microalgas, o que tem resultado em inúmeros trabalhos e revisões sobre o assunto (CHENG; JUANG; LIAO et al. 2011; CHRISTENSON; SIMS, 2011; GOUVEIA, 2011; BILAD et al., 2012a; FERRIOLS; AGUILAR, 2012; GRANADOS et al., 2012; BEUCKELS et al., 2013; COWARD et al., 2013). Além disso, na otimização de cada sistema de produção de biomassa de microalgas deve-se considerar todas as características do microrganismo e as etapas de processamento que precedem a colheita (GUDIN et al., 1991). Na Figura 5.1, é apresentado o processo de colheita das microalgas nos sistemas de cultivo em fotobiorreatores abertos e fechados.

Os principais estágios da produção de microalgas destacados no diagrama (Figura 5.1) são: o cultivo em fotobiorreatores abertos e fechados, e a colheita da biomassa englobando processos físicos, químicos ou biológicos, com a sedimentação ou flotação da biomassa no recipiente de colheita. Embora existam diversos compostos (óleos e pigmentos) extraídos da biomassa microalgal concentrada úmida, a secagem é importante e pode ocorrer em secadores convencionais como estufas com aquecimento e circulação de ar, em câmaras com insufladores com temperatura ambiente ou em secadores solares, antes dos processos de extração de substâncias como proteínas, ácidos graxos e carboidratos.

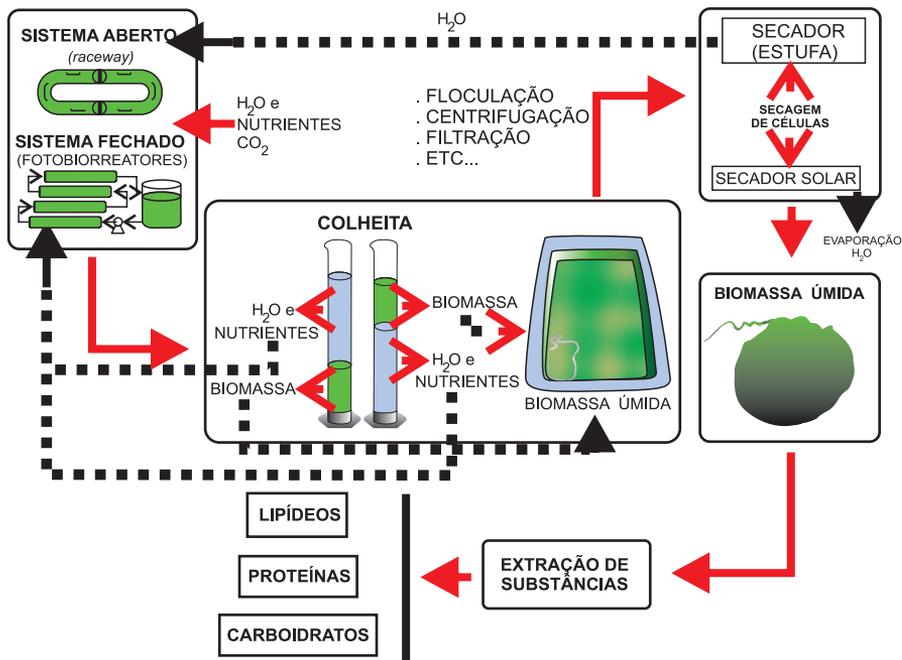


Figura 5.1. Diagrama esquemático do processo de cultivo das microalgas nos sistemas de cultivos em fotobiorreatores abertos e fechados, destacando-se as etapas coagulação/floculação das células e colheita da biomassa.

Os principais fatores que contribuem significativamente para aumentar as dificuldades na recuperação da biomassa de microalgas incluem:

- A morfologia celular: formato (esféricas, em cadeias ou filamentosas), tamanho (entre 2,0 μm e 30,0 μm para eucariontes e 0,2 μm e 2,0 μm para cianobactérias), peso específico e carga de superfície, geralmente negativa (SING; ISDEPSKY; BOROWITZKA et al., 2013);
- A densidade do cultivo da microalga, geralmente com alta taxa de diluição e concentrações de células varian-

do de 0,3 a 2,0 g L⁻¹ dia⁻¹ (MOLINA GRIMA; BELARBI; ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2003a; VANDAMME et al., 2011);

- c) Técnicas escolhidas para concentração de células e separação líquido-sólido;
- d) Custo e eficiência do processo;
- e) Aplicação final da biomassa de microalgas.

5.1.1 Coagulação/floculação de células de microalgas

As microalgas possuem cargas negativas superficiais, que impedem a agregação e mantêm as células em suspensão. Assim, os coagulantes/floculantes agem sobre a superfície celular, neutralizando as cargas da parede celular da microalga, o que resulta na agregação e sedimentação/decantação de células no cultivo (BORGES et al., 2011). Um grande número de produtos químicos têm sido testados como coagulantes/floculantes.

O pré-tratamento por coagulação envolve ajustar o pH ou adição de eletrólitos, já por floculação envolve a adição de polímeros catiônicos; tais estratégias são convenientes, pois permitem tratamento rápido de grandes volumes de cultivos de microalgas (OH; LEE; PARK et al., 2001). Em seguida, com a aproximação e colisão das partículas desestabilizadas, ocorre a formação de flocos, que podem ser removidos por sedimentação, flotação ou filtração.

A coagulação é definida como a agregação de células como resultado do ajuste do pH ou eletrólitos e consiste na desestabilização das partículas coloidais e suspensas realizada pela conjugação de ações físicas e reações químicas, com duração de poucos segundos.

Em processos de tratamento de água e lagoas fotossintéticas, são utilizados sais de alumínio ou de ferro como agentes coagulantes, uma vez que em solução aquosa os íons metálicos

de ferro e de alumínio, positivamente carregados, formam fortes ligações com átomos de oxigênio, podendo coordenar até seis moléculas de água ao seu redor, liberando os átomos de hidrogênio e, assim, aumentando a concentração do íon H^+ e reduzindo o pH da suspensão. Esse processo é denominado hidrólise e os produtos formados constituem as espécies hidrolisadas de ferro e alumínio, que podem precipitar como hidróxidos de metal, dependendo da dose utilizada (LIBÂNIO, 2010; RICHTER et al., 2003). Posteriormente, em uma etapa denominada mistura rápida, verifica-se o transporte das espécies formadas para o contato com as impurezas presentes causando, em função da dosagem e pH de coagulação, a desestabilização ou envolvimento nos precipitados. Em seguida, com a aproximação e colisão das partículas desestabilizadas, ocorre a formação de flocos, que podem ser removidos por sedimentação/decantação, flotação e filtração. Assim, a coagulação em cultivos de microalgas é conhecida por relacionar-se com o pH do meio de cultivo (HORIUCHI et al., 2003; PAPAZI et al., 2010).

A correlação entre a concentração de células e a concentração do coagulante permite supor que o mecanismo predominante de desestabilização é a neutralização de cargas e não a floculação denominada de varredura, que é o uso ineficiente do coagulante. No caso de floculação por varredura, não existe relação estequiométrica entre a concentração de células de microalgas e a dose ótima do coagulante (PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010).

5.1.2 Tipos de coagulantes/floculantes

Os coagulantes/floculantes podem ser categorizados em classes: sintéticos inorgânicos, sintéticos orgânicos e os biofloculantes e, assim, os tipos de floculação de acordo com seus agentes floculantes. Na primeira etapa da coagulação/floculação, o composto químico (coagulante) reduz a carga da superfície celular, formando o precipitado de células, que aumenta

a agregação e a sedimentação (MOLINA GRIMA; FERNANDEZ; MEDINA, 2004; PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010).

A floculação pode ser alcançada por meio da utilização de floculantes inorgânicos como o sulfato de alumínio, $Al_2(SO_4)_3$, o cloreto férrico, $(FeCl_3)$, o sulfato férrico, $Fe_2(SO_4)_3$, e a cal, CaO , e um óxido forte produzido de carbonato de cálcio, $CaCO_3$ (MORALES et al., 1985; PAPAZI et al., 2007; PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010; VANDAMME et al., 2010; OSTERMAIER et al., 2012); KIM et al., 2011). Esses floculantes inorgânicos produzidos à base de ferro e alumínio são eficazes para a floculação de microalgas e podem ser utilizados para reduzir os custos de produção, mas, normalmente, esses agentes proporcionam contaminação da biomassa com metais e a produção de efluentes tóxicos (MOLINA GRIMA; BELARBI; ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2003a).

Floculantes orgânicos, tais como a quitosana e os amidos, são biodegradáveis e muitas vezes utilizados em baixas concentrações (SINGH et al., 2000; VANDAMME; FOUBERT; MEESCHART et al., 2010) e, com isso, contribuem para a proposta de sustentabilidade do sistema (SHARMA et al., 2006). O custo estimado de produção de quitosana para tratamento de 50.000 L a 500.000 L de cultivo, dependendo da concentração de microalgas, é inferior a US\$ 2,00 por kg (DIVAKARAN; SIVASANKARA PILLAI, 2002). No entanto, esse custo ainda é relativamente alto, dependendo da finalidade do cultivo da microalga (HARITH; YUSOFF; MOHAMED et al., 2009).

Borges e colaboradores (2011) reportaram que, para a produção de biodiesel, o uso dos floculantes aniônicos e catiônicos à base de poli(acrilamida) para concentrar as células das espécies marinhas, *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*, não interfere no percentual lipídico da biomassa dessas microalgas e, ainda, contribuem para aumentar a qualidade pela remoção de ácidos graxos insaturados. No entanto, se os objetivos do cultivo dessas microalgas são comercializar ácidos graxos específicos, por exemplo o ácido oleico (C18:n9C), recomenda-se evitar o uso desses floculantes, especialmente

a poliacrilamida Magnafloc® LT-25. A utilização desses flocculantes também alterou a composição do perfil dos ácidos graxos de *Botryococcus braunii* (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2009). Os flocculantes à base de polímeros catiônicos neutralizam as cargas negativas da superfície das células e modificam as interações eletrostáticas repulsivas, induzindo a agregação das células. As propriedades importantes de um flocculante polimérico são: peso molecular, densidade de carga e configuração da sua estrutura. A concentração ótima de flocculação, portanto, corresponde a uma situação na qual a superfície das células em meio de cultivo é parcialmente coberta por manchas de polímeros catiônicos. As células têm cargas negativas na superfície e quando entram em contato com polímeros catiônicos ocorre inversão de cargas, reduzindo a força de repulsão entre as células. Os polímeros absorvidos, devido ao seu tamanho, são capazes de formar uma ligação entre as células, formando os flocos (RICHMOND, A., 2004b). Alterações em quaisquer dessas propriedades podem melhorar a capacidade de ligação do flocculante à microalga (HARUN et al., 2010).

Polímeros orgânicos catiônicos podem induzir flocculação eficiente de microalgas de água doce em baixas concentrações, entre 1 e 10 mg L⁻¹; em cultivos de microalgas de ambientes marinhos, com elevada salinidade, ocorre a inibição da flocculação com polieletrólitos. Em alta força iônica, o polímero é reduzido para suas menores dimensões, reduzindo a ligação entre as células de microalgas (BILANOVIC et al., 1988). Molina-Grima e colaboradores (2003a) em revisão sobre a colheita de microalgas relatam que polímeros orgânicos polivalentes têm efeitos flocculantes para *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. e discutem a especificidade dos polímeros, mostrando que *Chlorella* sp. pode ser flocculada com polímero catiônico, mas não com polímero aniônico.

Os polímeros catiônicos agem como coagulantes/flocculantes, neutralizando cargas negativas da superfície (parede) das células de microalgas e reduzindo a repulsão elétrica entre elas, favorecendo, assim, que as células se agreguem e acon-

teça a formação de flocos com maior peso que se depositam no fundo dos tanques/fotobiorreatores. Por outro lado, os polímeros aniônicos se ligam à superfície negativa das células. Apesar de repulsão eletrostática, ocorre a presença de íons que agem como pontes entre o polímero e as células (BOLTO; GREGORY, 2007), possibilitando a agregação.

A floculação utilizando produtos químicos, muito utilizada na remoção de algas das lagoas de tratamento de resíduos industriais e aplicações no tratamento de águas de saneamento urbano (RICHTER et al., 2003; LIBÂNIO, 2010), também tem aplicação nos cultivos de microalgas. Portanto, uma grande variedade de produtos químicos tem sido estudada como agentes floculantes (LEE et al., 1998). Na Tabela 5.1 são sumarizados exemplos de coagulantes/floculantes químicos e biológicos utilizados para auxiliar no pré-tratamento de células de microalgas no processo de colheita.

Por exemplo, se o objetivo do cultivo é obter pigmentos, sais de ferro são impróprios para a floculação, porque alteram a coloração das células. Papazi e colaboradores (2010) relataram que utilizando sais de ferro a cor verde das células foi alterada para amarelo escuro, principalmente acima da dose de 1 g L^{-1} deste composto químico. A atividade de cátions é determinada em grande extensão pela sua eletronegatividade. Os íons de cálcio, magnésio e amônio têm menor atividade eletromagnética do que os íons de ferro e zinco, explicando porque os sais de alumínio, ferro e zinco foram mais eficientes na coagulação das células de microalgas no intervalo de 24 h.

Quitosana, um polímero de acetilglucosamina, contém grupos funcionais amino que são atraídos por ânions e é um floculante com comprovada eficiência com várias microalgas. A alta carga catiônica da quitosana permite a forte adsorção na superfície negativa das células das microalgas e, efetivamente, realizam a desestabilização destas; e esse mecanismo pode ocorrer através da formação de pontes ou da neutralização de cargas (efeito eletrostático) (RENAULT et al., 2009).

Tabela 5.1. Exemplos de produtos coagulantes/floculantes e sua eficiência na recuperação da biomassa de microalgas.

Floculante/ Coagulante	Microalga	Biomassa (g L ⁻¹)/ Densidade óptica	Eficiência da floculação (%)	Referência
Amido catiônico	<i>Parachlorella</i> , <i>Scenedesmus</i>	0,075~0,35	90	(1)
Amido catiônico de mandioca (0,05v/v)	<i>Neochloris oleoabundans</i>	-	69-87	(2)
Polímeros catiônicos	<i>Isochrysis galbana</i> e <i>Chlorella stimatophora</i>	-	> 90	(3)
Quitosana	<i>Spirulina</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Chlorella</i> sp. e <i>Synechocystis</i> sp.	-	> 90	(4)
Quitosana (pH < 7,0)	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Chlorella sorokiniana</i>	-	> 90 > 99	(5)
Poly (ácido γ-glutâmico)	<i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Chlorella protothecoides</i>	0,57 0,60	> 90	(6)
FeCl ₃	<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,05~0,12	> 90	(7)
pH 4,0 com HNO ₃	<i>Chlorococcum nivale</i> , <i>Chlorococcum ellipsoideum</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.	1,0~6,0	> 90	(8)

Continua.

Tabela 5.1. Continuação.

Floculante/ Coagulante	Microalga	Biomassa (g L ⁻¹)/ Densidade óptica	Eficiência da floculação (%)	Referência ³
pH 8,6 e 10,5 (NaOH)	<i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i> ,			
pH 9,0 (NaOH e Ca(OH) ₂)	<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i> e <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>	0,428 e 0,450	> 90 > 90	(9)
CaCl ₂ , NaOH, FeSO ₄ , Al ₂ (SO ₄) ₃ e óleo de <i>Moringa</i> <i>oleifera</i>	<i>Tetraselmis</i> <i>tetrahele</i>	-	> 95	(10)
(Al ₂ (SO ₄) ₃ , AlCl ₃ , Fe ₂ (SO ₄) ₃ , FeCl ₃ ZnSO ₄ e ZnCl ₂)	<i>Chlorella</i> <i>minutissima</i>	-	-	(11)
Policloreto de Al, quitosana, (Al ₂ (SO ₄) ₃ , pH alcalino	<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	0,104	> 90	(12)

Referências: (1) Vandamme, Foubert e Meesschaert et al. (2010); (2) Helder et al. (2012); (3) Bilanovic et al. (1988); (4) Divakaran e Sivasankara Pillai (2002); (5) Ahmad et al. (2011); (6) Zheng et al. (2012); (7) Wyatt et al. (2012); (8) Liu et al.; Zhang (2013); (9) Horiuchi et al. (2003); (10) Ferriols e Aguilar (2012); (11) Papazi, Makridis e Divanach (2010); (12) ŞIRIN et al. (2012).

Quitosana é facilmente manufaturada e é requerida em baixas doses, mas seu poder é reduzido em água salgada/salobra, isto é, com alta condutividade elétrica. A dosagem ótima varia grandemente e aparentemente não existe correlação consistente entre grupos taxonômico de microalgas e quantidade

ótima de quitosana para floculação ótima. Uma das vantagens desse composto é não ser tóxico, não corrosivo e seguro para manuseio. Outras vantagens é ser biodegradável, biocompatível e possuir propriedades importantes de adsorção, habilidade floculante e polieletrólítica, adicionalmente pode ser recuperada em diversas aplicações (KUMAR, 2000). Como a quitosana é amplamente utilizada em alimentos e medicamentos, fornece um procedimento rápido e seguro para a concentração de microalgas cultivadas comercialmente. Além disso, as células das algas floculadas permanecem intactas. Esta é uma vantagem adicional em aplicações nas quais os produtos químicos e medicamentos produzidos por algas modificadas geneticamente precisam ser recuperados do meio de cultivo (DIVAKARAN; SIVASANKARA PILLAI, 2002).

Ahamed e colaboradores (2011) encontraram que a quitosana pode ser um efetivo coagulante em termos de adsorção e coagulação das células de microalgas no meio de cultivo. Os autores sugeriram que esse polímero tem alta carga catiônica, densidade de cadeias longas, levando à formação de pontes e subsequente precipitação. A quitosana induz remoção satisfatória das células de microalgas por causa de seus grupos funcionais amino. Na colheita de *Chlorella* sp., esses autores encontraram as seguintes condições otimizadas de floculação: 10 ppm de quitosana, tempo de agitação de 20 minutos, taxa de agitação de 150 rotações por minuto (rpm) e taxa de sedimentação de 20 minutos. Esses parâmetros resultaram em uma eficiência de remoção de 99,0% das células da microalga *Chlorella* sp.

Polímeros catiônicos orgânicos quando aplicados em doses baixas (entre 1 e 10 mg L⁻¹) podem flocular células de microalgas de água doce. No entanto, a alta salinidade do ambiente marinho parece ser responsável por inibir a floculação com polieletrólitos. A redução da eficiência na floculação de células de microalgas com polímeros catiônicos em ambiente marinho e em água salobra é atribuída, principalmente, ao efeito da força iônica na configuração e dimensão do polímero, como indicado por alterações na viscosidade intrínseca (BILANOVIC; SHELEF; SUKENIK, 1988).

5.1.3 Floculação química para concentração de células

A floculação química é considerada um meio confiável e econômico para a colheita de microalgas. A floculação consiste na remoção da capacidade das células de serem mantidas em suspensão ou na estimulação da agregação, formando flocos que podem decantar ou flotar. Essa técnica é viável para recolher biomassa em qualquer sistema de cultivo aberto ou em fotobiorreatores fechados e bastante adequada em sistemas de grande porte, podendo ser espontânea ou induzida (LOURENÇO, 2006). A floculação é o pré-tratamento de células mais conveniente no processo de colheita, pois permite a manipulação de grandes volumes de cultura de microalgas com baixos custos de energia. Além disso, as células concentradas por floculação estão em melhor condição física do que aquelas manipuladas apenas por centrifugação ou filtração, pois a manutenção da integridade celular é muito importante para a preservação dos metabólitos produzidos (KNUCKEY et al., 2006). Alguns fatores podem influenciar a ação dos floculantes, como o pH, altas concentrações de células, alta força iônica do meio de cultivo e teor de matéria orgânica, por exemplo (BEUCKELS; DEPRAETERE; VANDAMME et al., 2013).

A eficiência da floculação pode ser definida como a razão entre a massa de células de microalgas recuperadas e o total de massa das células e a porcentagem da eficiência de floculação pode ser calculada pela seguinte equação:

$$(i) \text{ Eficiência da floculação (\%)} = A_oV_o - A_1V_1/A_oV_o \times 100$$

O fator de concentração representa a razão entre o produto final da concentração e a concentração final (BOSMA; VAN SPRONSEN; TRAMPER et al., 2003). O cálculo do fator da concentração pode ser feito pela seguinte equação:

$$(i) \text{ Eficiência da floculação (\%)} = A_oV_o - A_1V_1/A_oV_o \times 100$$

$$(ii) \text{ Fator de eficiência} = A_2 \text{ DO}_{680}/A_1 \text{ DO}_{680} \text{ antes floculação}$$

Onde:

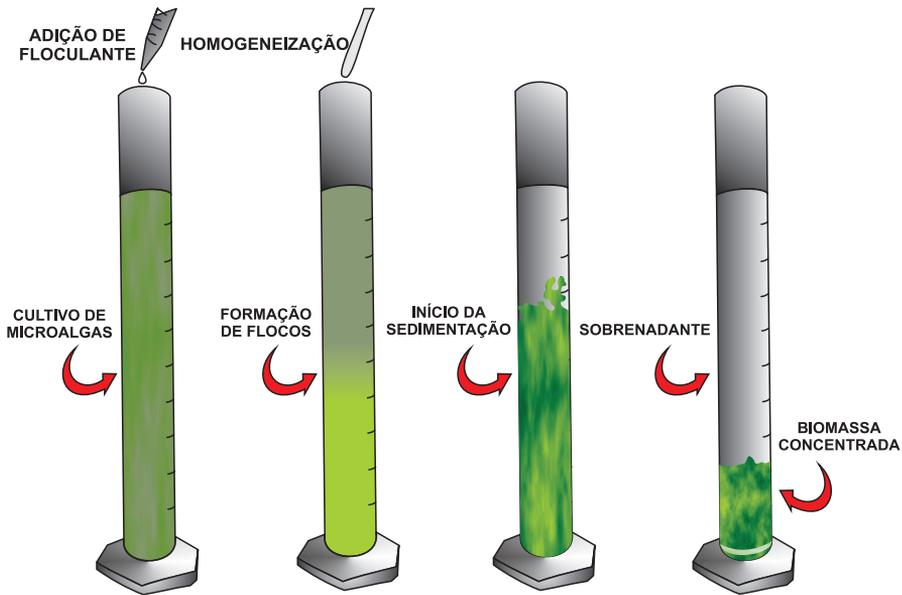
- A1 é a densidade óptica do sobrenadante da metade da altura da camada clarificada após a floculação;
- A2 é a DO_{680} da suspensão depois da floculação;
- A0 é a DO_{680} da suspensão de microalgas antes da floculação.

A autofloculação ou floculação espontânea pode se desenvolver em cultivos de microalgas como resultado do aumento do pH do meio de cultivo ou devido à biofloculação (SHELEF et al., 1984; SUKENIK et al., 1988; YAHY et al., 1994), já a biofloculação com bactérias ou outras espécies de microalgas pode ser induzida para a colheita em cultivos abertos e fechados (EISENBERG et al., 1981; OH; LEE; PARK et al., 2001; LEE et al., 2009). Já na floculação/biofloculação induzida, podem ser realizadas técnicas como a eletrocoagulação/floculação, eletrólise da água, utilização de flocculantes químicos inorgânicos ou orgânicos, bem como os bioflocculantes.

Para ocorrer a floculação, é necessária a adição de um composto inorgânico ou orgânico no meio de cultivo para reduzir as cargas negativas da superfície celular, induzindo a adesão de várias células que podem flotar ou sedimentar.

Uma ilustração em pequena escala dos processos envolvidos na floculação em um cultivo de microalgas é apresentado na Figura 5.2.

A alcalinização do meio de cultivo para valores entre 11 e 12 tem sido uma estratégia utilizada para aumentar a eficiência de floculação, alcançando valores acima de 80%. Magesh e colaboradores (2009) mostraram que a eficiência de floculação das células de *Chlorella vulgaris* em pH 10,38 atingiu 98% com recuperação de até 94% do lipídeo total da biomassa flocculada. Floculação induzida por aumento do pH foi avaliada para a colheita de microalgas e reutilização de meio de cultivo, contribuindo assim para a produção econômica do biodiesel a partir



Fonte: Silva (2013).

Figura 5.2. Esquema dos processos sequenciais de flocculação e sedimentação de cultivos de microalgas, utilizando coagulantes/floculantes que podem ser químicos (inorgânicos ou orgânicos), físicos ou biológicos.

de microalgas. Aumentando o valor do pH do meio, induziu a maior eficiência de flocculação com até 90% para microalgas de água doce (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Chlorococcum* sp.) e microalgas marinhas (*Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornerutum*). Adicionalmente, esse estudo revelou que as concentrações de biomassa de microalgas e polissacarídeos liberados pelas células microalgais podem influenciar na eficiência de flocculação e que, o meio de cultivo flocculado, após neutralização do pH e suplementação com nutrientes, proporciona rendimento de crescimento algal similar ao do meio de cultura fresco (WU et al., 2012).

A flocculação com o uso de coagulantes/floculantes químicos é um processo que envolve alguns custos e, ainda, pode

gerar contaminação química da biomassa, o que requer cuidados para evitar danos e alterações químicas significativas. O efluente liberado também pode ser contaminado, dependendo do coagulante/floculante empregado, o que pode ser uma desvantagem associada ao sistema, bem como da perspectiva da aquicultura ou produção de alimentos para ruminantes (LOURENÇO, 2004; MOLINA GRIMA; FERNANDEZ; MEDINA, 2004).

O desempenho da floculação ocorre em função de vários fatores, incluindo:

- a) O peso molecular do floculante: quanto maior for o peso molecular, melhor;
- b) A ligação entre células e o floculante;
- c) A densidade de carga floculante: quanto maior for a densidade de carga mais estendida a conformação molecular e a neutralização de cargas das células;
- d) Concentração de floculante: altas doses podem conduzir à estabilização das células;
- e) Concentração de células no meio de cultivo: quanto maior a concentração de células, maior a frequência de colisão e maior a taxa de floculação.

A floculação das células de microalgas, antes da colheita por centrifugação ou filtração, é um processo mais conveniente se comparado aos métodos tradicionais, pois permite o tratamento de grandes volumes de microalgas com um baixo custo operacional.

Diante de todas as vantagens dos floculantes, atualmente essa linha de pesquisa está em crescimento. Informações disponíveis sobre o possível efeito desses elementos na quantidade e qualidade dos lipídeos extraídos das microalgas foram relatados por Borges e colaboradores (2011) e destacados na revisão de Gouveia (2011).

A técnica de coagulação/floculação utilizada deve ser compatível com a necessidade de reciclar a água para o sistema de

crescimento sem um procedimento complexo para o pré-tratamento da mesma. Nesses casos, a quitosana é um polímero orgânico sugerido como adequado para a floculação (DIVAKARAN; SIVASANKARA PILLAI, 2002; AHMAD; MAT YASIN; DEREK et al., 2011; ŞIRIN; TROBAJO; IBANEZ et al., 2012). Esses floculantes orgânicos, tais como a quitosana, são biodegradáveis, geralmente, usados em doses menores e porque após a colheita das células sedimentadas/flotadas, a solução nutritiva torna-se reutilizável para crescimento de microalgas ou de plantas em hidroponia antes da liberação da água ao ambiente.

Com o objetivo de melhorar a eficiência da colheita de *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, uma das etapas mais caras da produção de microalgas, Castrillo e colaboradores (2013) induziram a floculação de células elevando os valores de pH com a adição de NaOH e Ca(OH)_2 , seguida de sedimentação. Nesse estudo, a reutilização do meio de cultivo, procedimento indicado para economia de água, mostrou potencial de reuso desde que ocorra a suplementação de nutrientes no meio de cultivo.

A floculação de *Chlorella vulgaris* foi estudada por Beuckels e colaboradores (2013) utilizando a combinação de alteração do pH e a adição de fosfato de cálcio no meio de cultivo. Comparando ácidos húmicos ou alginatos com glicose ou acetato que foram adicionados ao meio de cultivo, os autores sugeriram que a floculação é inibida pelo teor de matéria orgânica e pela formação de cristais de fosfato de Ca ou, ainda, podem estar relacionados à complexação do Ca^{2+} . A precipitação de fosfato de cálcio no meio de cultivo com alto teor de matéria orgânica requer água com elevada força iônica ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Ca^{2+}) e alta concentração de PO_4^{3-} ($350 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato). A condução da floculação por fosfato de cálcio deve ser na faixa de pH entre 8,5 e 9,0 se o cultivo contem cálcio ($1.500\text{-}2.500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fosfato suficientes ($100\text{-}200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Esse procedimento de pré-tratamento de concentração de células é uma opção atrativa no caso da produção de microalgas para biodie-

sel utilizando águas residuárias da suinocultura, ricas em PO_4 para conhecer detalhes sobre a composição química deste meio alternativo de cultivo.

A eficiência da floculação para a colheita da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em sistema de lagoa aberta foi estudada em função do pH do meio de cultura, do tipo de floculante (FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, quitosana, poliacrilamida), da dose do floculante e do tempo de sedimentação.

Os resultados desse trabalho indicaram que a eficiência de floculação alcançou 97,4% após 10 minutos de sedimentação, quando o pH foi ajustado para 11,5, sem a adição de floculante. Quitosana e FeCl_3 mostraram boa eficiência de floculação quando utilizados nas doses de 0,15 e 0,08 g L^{-1} , respectivamente, sem ajustes do pH do meio de cultivo. A eficiência da floculação aumentou com incrementos variando de 68,2% a 92,8% após a adição de 0,1 g L^{-1} de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, seguido do ajuste do pH (CHEN et al., 2013).

5.1.4 Coagulação/floculação com agentes físicos

5.1.4.1 Separação magnética/ultrassom

A separação magnética é um método rápido e simples para concentração de microalgas e consiste na mistura de nanopartículas de Fe_3O_4 ou outras partículas magnéticas; após um tempo de agitação e homogeneização do cultivo um ímã é colocado na parte inferior do recipiente para formar o campo magnético (BITTON et al., 1975; XU et al., 2011). A vantagem desse processo está relacionada ao baixo custo de funcionamento, economia de energia e fácil operação. Xu e colaboradores (2011) relataram os resultados da concentração de células das microalgas *Botryococcus braunii* e *Chlorella ellipsoidea*, utilizando nanopartículas para a separação magnética. Nesse estudo, a eficiência de recuperação de células alcançada para

ambas microalgas, *B. braunii* e *C. ellipsoidea*, foi acima de 98% dentro de 1 minuto e o mecanismo de adsorção foi considerado como sendo o principal, devido à atração eletrostática entre as nanopartículas magnéticas e as células das microalgas.

Para a colheita e separação de células de microalgas também pode ser aplicada a técnica que utiliza ultrassom, consistindo num transdutor e um refletor dentro de uma câmara de ressonância onde os organismos são continuamente bombeados (BOSMA; VAN SPRONSEN; TRAMPER et al., 2003). Em funcionamento, esse aparelho gera campos ultrassônicos com níveis altos e baixos de energia potencial. Assim, a aglomeração das células microalgais ocorre com a ajuda desses campos ultrassônicos, causando interação entre as células, o que resulta em uma força de atração que as leva para os pontos de encontro da onda ultrassônica, formando um aglomerado. As vantagens dessa técnica de separação em comparação com os processos convencionais são: não gera cisalhamento das células, opera em forma contínua e possui ausência de falhas mecânicas, sendo uma técnica não-incrustante e com eficiência em torno de 90% na concentração de biomassa.

5.1.4.2 Eletrocoagulação/eletrofloculação

A separação da parte sólida das células da parte líquida do meio de cultivo tem ocorrido por coagulação e floculação, seguida de sedimentação ou decantação aplicadas na parte inferior do sistema de cultivo. A flotação pode ter vantagens devido à baixa gravidade específica dos sólidos. Embora o processo de flotação mais comum seja dissolver ar, a eletroflotação, baseada na eletrólise do soluto para produzir bolhas de gás e induzir algumas reações químicas, não é uma novidade. Em Israel, essa técnica é tradicional e bastante utilizada para diversos fins, conforme foi relatado por Sandbank e colaboradores (1974) para reuso de águas de efluentes.

Entre os métodos físicos de floculação inclui o da eletrocoagulação/floculação, que consiste no uso de eletrodos à base de ferro ou alumínio, muitas vezes em aço inoxidável, e reativos, ligados diretamente a uma fonte de alimentação de energia. Esses eletrodos liberam íons de alumínio ou ferro que reagem com a água do cultivo formando hidróxidos metálicos carregados positivamente que se ligam à superfície negativa das células de microalgas e desestabilizam a suspensão microalgal por neutralização da carga; dessa forma ocorre a formação de flocos que podem decantar ou flotar (SANDBANK; SHELEF; WACHS, 1974; UDUMAN et al., 2011; VANDAMME et al., 2011). No caso do ânodo de ferro, não é claro se os íons ferrosos ou férricos são formados durante a eletrocoagulação/floculação, além disso, Fe^{2+} pode ser rapidamente oxidado na solução Fe^{3+} na presença de oxigênio. A liberação de Fe^{2+} durante a eletrocoagulação/floculação leva à formação de precipitados de hidróxidos de coloração verde, enquanto íons de Fe^{3+} resultam em precipitados de hidróxido amarelados. Em ambos ânodos, de alumínio e ferro, a água é oxidada e o oxigênio produzido. As vantagens desse processo estão relacionadas ao baixo custo de operação comparado a outras técnicas e por não utilizar produtos químicos para concentrar a biomassa, não ocorrendo a utilização de ânions à base de cloro ou sulfato (UDUMAN; BOURNIQUEL; DANQUAH et al., 2011). Essa técnica é segura, seletiva e muitas vezes rentável, com eficiência em torno de 99% para *Tetraselmis* sp. e de 98% para *Chlorococcum* sp. A principal desvantagem está relacionada à necessidade de substituição regular do ânodo e possível contaminação da biomassa por metais liberados por ele. Esse efeito negativo pode ser superado pela substituição por eletrodos neutros. Vandamme e colaboradores (2011) obtiveram em cultivos com as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricornutum* eficiência de recuperação da biomassa acima de 80%, sendo que a eficiência desse processo com a utilização de ânodo de alumí-

nio foi significativamente maior do que com o ânodo de ferro e melhorada com a redução do pH inicial do cultivo e o aumento da agitação do cultivo de 80 rpm para 150 rpm. Os autores mostraram a reprodutibilidade desse processo, trabalhando sob as seguintes condições experimentais: ânodo de alumínio; pH igual a 4,0; tempo de sedimentação de 30 minutos; e, velocidade de agitação de 150 rpm. Para ambos os tipos de microalga foram utilizadas duas densidades de corrente, as mais baixas da gama testada (1,5 e 3 mA cm² para *Chlorella vulgaris* e 0,6 e 1,5 mA cm² para *Phaeodactylum tricornutum*). Os autores sugerem baixa densidade de corrente para reduzir a liberação do alumínio e que sob condições ótimas, o consumo de energia da eletrocoagulação/floculação foi de aproximadamente 2 kWh kg⁻¹ de biomassa colhida para *C. vulgaris* e de cerca de 0,3 kWh kg⁻¹ para *P. tricornutum*. A especiação do hidróxido de alumínio formado durante a eletrocoagulação/floculação é altamente variável e fortemente influenciada pelo pH do meio.

Para aumentar a eficiência da colheita de cultivos de microalgas, o método de eletrocoagulação e floculação pode ser integrado com a aplicação de ar disperso no cultivo líquido para induzir a flotação de células. Para a recuperação da biomassa de *Botryococcus braunii*, o processo de eletrofloculação foi utilizado com eletrodo de alumínio e a eficiência atingiu 93,6% após 30 minutos, quando esse processo foi integrado, a dispersão de ar para flotação aumentou significativamente, atingindo 98,9% de eficiência, após 14 minutos (XU et al., 2010). Esse processo de flotação com ozônio apresenta vantagens em relação à sedimentação. Com o uso da flotação com ozônio na faixa de 0,2 a 0,5 mg mg⁻¹ de biomassa microalgal foi possível fazer a colheita de *Scenedesmus oliquus* (estirpe FSP-3), sugerindo ser este um processo adequado para obter biomassa (CHENG et al., 2011).

As fases de crescimento de culturas de microalgas e interações intercelulares durante o cultivo têm influência na eficiência da concentração de células. Os resultados experimentais mostraram que as culturas de microalgas colhidas durante uma fase de baixa taxa de crescimento, por exemplo

de $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, permite uma maior taxa de sedimentação do que durante a fase de alta taxa de crescimento com $0,11 \text{ g}$ de biomassa $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A velocidade de deposição mais baixa foi observada em cultivos com alta densidade celular e foi atribuída à elevada estabilidade das células de microalgas, que eletrostaticamente repelem uma à outra durante essa fase do crescimento (DANQUAH et al., 2009).

5.1.5 Biofloculação

A biofloculação refere-se à floculação causada por biopolímeros produzidos por vegetais, algas ou outro microrganismos e que consiste na agregação natural das células, supostamente por decorrência de propriedades adesivas de carboidratos extracelulares das microalgas ou microrganismos crescendo associados, gerando flocos derivados de muitas células e nos processos não controlados que acarretam mudança de pH do meio de cultivo e agregação das células. A colheita eficiente de microalgas é um grande obstáculo para a comercialização da biomassa e seus coprodutos, portanto, o desenvolvimento de um método de exploração rentável é essencial para reduzir o custo de produção e tem sido uma busca constante, conforme a enorme quantidade de trabalhos encontrados nos bancos de referências sobre o tema. Os floculantes biológicos são os de maior potencial quando se objetiva minimizar o uso de substâncias químicas no sistema de produção de microalgas.

A entrada de alta energia para realizar a colheita de biomassa tem sido a causa da inviabilidade econômica da produção de biodiesel utilizando a biomassa de microalgas como matéria-prima. Algumas microalgas apresentam a capacidade não apenas de autoflocular como também de promover a floculação de outra microalga sem essa habilidade floculante, facilitando a sedimentação das células. As microalgas *Ankistrodesmus falcatus* e *Scenedesmus obliquus* foram utilizadas para fazer

a colheita de *Chlorella vulgaris* pelo processo de biofloculação (SALIM et al., 2011). Nesse estudo, os autores ainda examinaram o comportamento floculante da microalga marinha *Tetraselmis suecica*, para concentrar a biomassa celular de *Neochloris oleoabundans*. As microalgas testadas aumentaram a taxa de sedimentação e a recuperação de biomassa da *C. vulgaris* e *N. oleoabundans*. As vantagens desse método são que nenhuma adição de floculantes químicos foi necessária e que as condições de culturas similares podem ser utilizadas para as microalgas floculantes como para as microalgas de interesse que acumulam lipídeos. Além disso, as microalgas floculantes acumulam lipídeos e não há custos de investimento e operacionais extras envolvidos na sedimentação da biomassa de microalgas.

O papel de algumas bactérias no processo de floculação de microalgas é ainda pouco conhecido. Para a produção de biodiesel, a floculação microbiana é potencialmente um ganho significativo em relação aos outros métodos de colheita. Em escala maior, os meios de cultivos podem ser reutilizados para minimizar o custo de nutrientes e água. A biofloculação ou floculação biológica com microrganismos produtores de polímeros extracelulares cultivados em fonte de carbono orgânico (acetato, glicose ou glicerina), como substrato para o crescimento *in situ*, foi descrita por Lee e colaboradores (2009). Esses autores utilizaram bactérias que cresceram no meio de cultivo de cianobactérias (BG-11) para bioflocular a microalga marinha *Pleurochrysis carterae*. Submetidos ao estresse, devido ao esgotamento de nutrientes, esses microrganismos produzem de forma extracelular substâncias poliméricas capazes de promover a floculação. A eficiência de recuperação média foi em torno 90% e entre as vantagens relacionadas ao uso desse método está a de não causar danos à integridade das células de microalgas. A concentração mínima do substrato de carbono orgânico utilizada nesse estudo de floculação foi de 0,1 g L⁻¹ e ainda é elevada, em comparação com a concentração de matéria seca da

suspensão de microalgas, que é da ordem de 0,5 g L⁻¹. Por isso, são necessárias pesquisas para reduzir o nível de substrato e minimizar a energia de mistura necessária para esse processo.

A floculação é o pré-tratamento preferido para a colheita de microalgas, embora existam poucos naturais que possam ser utilizados nesse processo como, por exemplo, o tanino extraído de vegetais (TONHATO et al., 2011). A eficiência do método de floculação com ácido (γ PGA) para colheita das microalgas *Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris* (LICM001) e *Bottrriococcus brauni* (LICME003) foi superior a 95% (ZHENG; GAO; YIN et al., 2012).

Em outro estudo, foi demonstrado que as bactérias desempenham importante papel na floculação, pois aumentam o tamanho dos flocos formados e com isso facilitam a sedimentação de microalgas. Comparando o cultivo axênico de *Chlorella vulgaris* com o polixênico, foi observado que a atividade de floculação foi de 2% e 94%, respectivamente, mostrando o papel de substâncias extracelulares bacterianas no aumento da floculação. Análise de Eletroforese Desnaturante em Gel com Gradiente (DGGE) do gene 16S rRNA do cultivo polixênico de *C. vulgaris* revelou a presença de *Flavobacterium* sp., *Terrimonas* sp., *Sphingobacterium* sp., *Rhizobium* sp. e *Hyphomonas* sp. como as bactérias associadas ao cultivo de microalgas. No entanto, quando *Flavobacterium*, *Terrimonas*, *Sphingobacterium* foram eliminadas por Fluorescência Classificador de Células Ativador (FACS), a atividade de floculação reduziu para 3%. Os autores concluíram que a presença de certas bactérias foi fator determinante para a floculação de *C. vulgaris* (LEE et al., 2013). O biofloculante produzido pela bactéria *Paenibacillus* sp. (AM49) foi efetivo para a colheita de *Chlorella vulgaris* (OH; LEE; PARK et al., 2001).

A estirpe bacteriana de *Solibacillus silvestris* W01 isolada a partir de lodo ativado mostrou potencial para promover a colheita de microalgas marinhas para a produção rentável de bioprodutos. O uso do biofloculante a partir da cultura dessa estirpe (W01) de *S. silvestris* mostrou 90% de eficiência de floculação em cultivos da microalga marinha, *Nannochloropsis*

oceanica, e não foi necessário o uso de metal (Fe, Al e Zn) para o processo de floculação (WAN et al., 2013). A análise química desse biofloculante purificado indicou que é um proteoglicano composto de 75,1% de carboidratos e de 24,9% de proteína (massa/massa). Este biofloculante não apresentou nenhum efeito negativo sobre o crescimento de células de microalgas e o meio de cultivo pode ser reutilizado para a colheita econômica de *N. oceanica*.

O biofloculante produzido por *Paenibacillus polymyxa* (AM49) e utilizado na dose de 1% combinado com coagulantes inorgânicos CaCl_2 8,5 mM e FeCl_3 0,2 mM mostrou alta atividade de floculação com até 95% de eficiência para concentrar células de *Scenedesmus* sp. em cultivos de alta densidade e com reuso do meio de cultura (KIM; LA; AHN et al., 2011).

O biofloculante (MBF3-3) produzido por *Bacillus* sp. BF3-3 mostrou excelente atividade de floculação em águas residuais e pode ser utilizado em baixas quantidades se comparado ao cloreto de polialumínio (PAC), que é amplamente utilizado na floculação de águas residuais de cervejeira (FENG et al., 2008). Exceto o Fe^{3+} , íons de metais, incluindo Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Na^+ , apresentaram incrementos na atividade de floculação de MBF3-3 e esses efeitos estimulantes foram na seguinte ordem de aumento: $\text{Al}^{3+} >$ do que $\text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$. Esse biofloculante (MBF3-3) é composto principalmente de polissacarídeo ácido (66,1%) e proteína (29,3%), na qual polissacarídeo ácido foi o principal componente de floculação eficaz. Os grupos OH^- e COO^- podem desempenhar um papel vital na floculação de partículas em suspensão (FENG; XU, 2008). Também com biopolímero extracelular produzido por *Bacillus subtilis* (R 23), Bajaj e colaboradores (2011) observaram excelente atividade de floculação. O biopolímero foi confirmado como poli (ácido γ -glutâmico) (PGA). A atividade floculante do PGA foi estimulada pela adição de cátions bivalentes e trivalentes e pelo pH da mistura de reação. Os fatores sobre floculação de *Botryococcus braunii* foram a concentração de FeCl_3 , o bioflo-

culante produzido pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* (estirpe AM49) e o tempo de mistura. A eficiência da atividade floculante para o cultivo de *B. braunii* com concentração de $1,1 \text{ g L}^{-1}$ foi de 90,6% sob as condições ótimas de 0,79 mM de FeCl_3 , 0,58% (v/v) do biofloculante de *P. polymyxa* e tempo de agitação de 180 segundos a 80 rpm (KIM et al., 2013).

Uma nova abordagem de cultivo de células peletizadas foi descrita com o uso de cocultura de fungos filamentosos com microalgas, de modo que as células podem ser peletizadas com o fungo, o que contribui para tornar a colheita mais fácil tecnicamente. Esse novo processo pode ser aplicado a culturas de microalgas em ambas as condições de cultivo, autotróficas e heterotróficas, para permitir que as células se associem, formando grânulos de células e facilitando a filtração quando comparado às células individuais. A aplicação dessa metodologia tem o potencial de reduzir significativamente o custo de processamento para a geração de biocombustível a partir de microalgas (ZHANG et al., 2012).

Para superar as barreiras técnicas de produção de biocombustíveis de microalgas fotossintéticas e biorrefinarias, uma tecnologia nova de cultivo foi desenvolvida para concentrar as células, colheita e aumentar a produção de biocombustíveis e coprodutos à base de microalgas por meio de peletização. A tecnologia envolve o cultivo de microalgas em associação com outro microrganismo e um exemplo do sucesso dessa cocultura foi reportado por Xie et al. (2013) para *Chlorella vulgaris* cultivada com o fungo filamentoso *Cunninghamella echinulata*. Além disso, o processo de peletização resultou em um aumento significativo da biomassa, dos lipídeos e de bioprodutos. Essa tecnologia tem potencial de melhorar a sustentabilidade e a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis de microalgas em escala industrial.

Lee e colaboradores (2010) mostraram os requerimentos energéticos e a análise econômica de um sistema de floculação microbiana em grande escala para a colheita de biomassa de microalgas. A energia requerida estimada pela incorporação

de um floculador hidráulico foi equivalente a 0,893 kwh por 10^3 kg de biomassa de microalgas seca após floculação. A comparação dos custos de colheita da biomassa de microalgas em diferentes sistemas de cultivo e separação são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Comparação dos custos de construção, energia e manutenção por m^3 de diferentes sistemas de colheita de biomassa de microalgas.

Processo de separação da biomassa/ Cultivo	Custo (US\$)	Convertido em 2009 ²	Custo em Reais (24/11/2013)	Referências
Centrífuga/ Fotobiorreator tubular ¹	1,02/ m^3	ND*	R\$ 2,33	Zittelli et al. (1999)
² Centrífuga de placa	1,70/kg de biomassa	A\$ 0,86	R\$ 1,80	Becker (1995)
² Floculante/ Flotação	1,39/kg de biomassa	A\$ 0,70	R\$ 1,46	Becker (1995)
² Tanque de sedimentação com floculante	1,25/kg de biomassa	A\$ 0,61	R\$ 1,28	Benemann et al. (1996)
² Eletrofloculação	0,11/kg de biomassa	A\$ 0,17	R\$ 0,36	Poelman et al. (1997)
¹ Centrífuga/ Raceways	0,35/ m^3	ND	R\$ 0,80	Richmond et al. (2001)
¹ Centrífuga/ Fotobiorreator em painel	2,70/ m^3	ND	R\$ 6,16	Cheng-Wu et al. (2001)
² Floculação microbiana	ND	A\$ 0,13	R\$ 0,27	Lee et al. (2010)

Fonte: Adaptada de ¹Joqueira e colaboradores (2010b) e ²Lee e colaboradores (2010). *Não determinado.

Para os trabalhos calculados por Joquera e colaboradores (2010b), a microalga foi a *Nannochloropsis* sp. e um valor médio de produção de biomassa seca de 100.000 kg. Lee e colaboradores (2010) converteram os custos nos trabalhos originais de US\$ por kg biomassa para A\$ por m³ de meio, considerando a média de concentração da biomassa de microalgas de 0,3 g L⁻¹ e o câmbio de US\$ 1,00 para A\$ 1,20. Para converter os custos em reais, o câmbio foi de A\$ 1,00 para R\$ 2,09 e de US\$ 1,00 para R\$ 2,28. Para facilitar o entendimento, os valores foram transformados em reais com base no câmbio comercial do dia 22 de novembro de 2013. O custo estimado de R\$ 0,27 ou (A\$ 0,13) por m³ se compara favoravelmente com outros métodos de colheita, as dimensões físicas do processo e o consumo de energia estão também dentro de um limite razoável. Portanto, em teoria, a colheita de biomassa de microalgas por floclulantes de origem microbiana é viável.

5.2 Colheita por Filtração

As diferentes formas de filtração incluem microfiltração, filtração de pressão e filtração a vácuo. A colheita de microalgas por filtração é um processo eficiente, que consiste em passar de maneira bem simples a microalga cultivada em meio líquido por um meio composto de material poroso, no qual ocorre a retenção das células (Figura 5.3). Nessa operação de filtração, pela qual se separa um sólido de um líquido mediante um meio poroso, utilizam-se membrana porosa, filtro ou tela de malha com tamanho definido, regular e adequado ao tamanho das células, podendo ser papel, tecido vegetal ou sintético, cerâmica ou uma camada fina de areia.

A escolha da composição do filtro ou malha regular depende do uso que será dado ao material filtrado e das dimensões das células da espécie em cultivo. Os filtros podem apresentar diversas composições como microfibras de vidro, acetato de estireno, celulose regenerada, com diâmetros que podem variar de 47 mm, 25 mm e 13 mm, e tamanho dos poros de 1,2 µm; 0,7 µm; 0,45 µm e 0,22 µm (LOURENÇO, 2006).

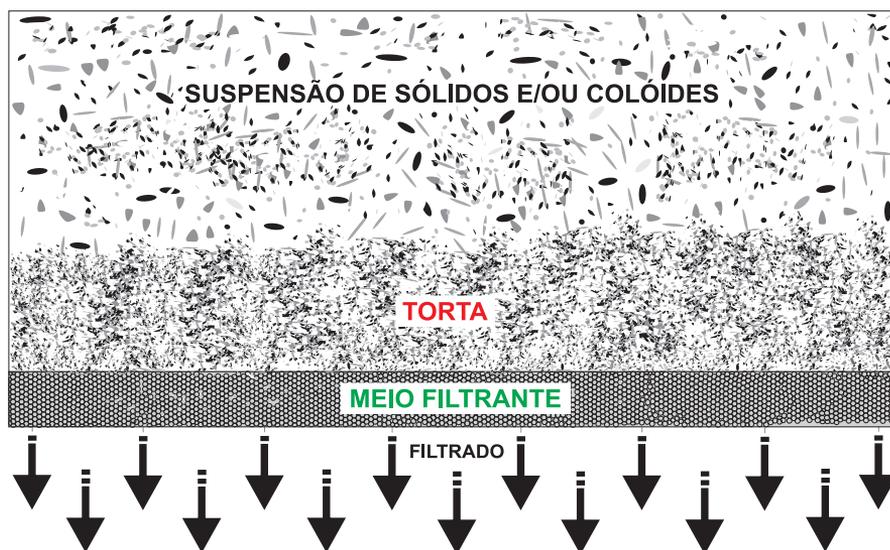


Figura 5.3. Esquema demonstrativo do processo de filtração do componente sólido-líquido.

O tamanho dos poros do meio poroso frequentemente é um pouco maior que o diâmetro médio das partículas a serem separadas, para que dessa forma não ocorra o entupimento dos poros por uma única partícula e com isso o rápido aumento da resistência hidráulica. Com poros maiores, a filtragem inicial se torna ineficiente, porém os poros podem ser bloqueados por conjuntos soltos de duas ou três partículas, permitindo fácil passagem de líquido e, após um período inicial, a filtragem é efetuada pelo próprio resíduo ou crosta de filtragem (BLACKADDER, 1982).

De acordo com Coulson e colaboradores (1965), as condições em que se realiza a filtração variam muito, dependendo do equipamento escolhido e a natureza do material a ser filtrado. Esses fatores podem ser:

- As propriedades do líquido, em particular sua viscosidade, massa específica e propriedades corrosivas;

- A natureza do sólido;
- A dimensão e a forma de suas partículas, distribuição granulométrica e características de empilhamento;
- A concentração de sólidos em suspensão;
- A quantidade de material a movimentar, no caso de microalgas o volume em litros por dia e o valor do produto a ser comercializado;
- A necessidade de lavagem dos sólidos filtrados.

Para um sistema de cultivo aberto, utilizando águas residuárias com adição de CO₂, em escala de 5 hectares, na Nova Zelândia, a inclusão dos sistemas de filtros de rocha e desinfecção com UV antes da liberação da água foi descrito por Carggs e colaboradores (2012).

Para a filtração de pequenos volumes, inferiores a um litro, utiliza-se normalmente um filtro de Büchner e um frasco *kitassato* de vidro borossilicato com saída superior para conectar a uma bomba de vácuo. Estes possuem a parte basal cônica ou cilíndrica, contendo um filtro de papel no qual o cultivo microalgal é colocado na parte de cima e flui por gravidade, ocorrendo a separação sólido-líquido. Como a resistência à passagem pelo meio poroso vai aumentando no decorrer do tempo, utiliza-se um frasco *kitassato* conectado a uma bomba a vácuo (Figura 5.4).

A filtração é uma técnica simples e que permite determinar com exatidão o volume equivalente do cultivo quando alcançados altos índices de separação da biomassa do meio de cultivo, informação útil em análises quantitativas com biomassa concentrada no filtro. Porém, em cultivo de grande escala a separação de grandes volumes de microalgas para posterior processamento da biomassa somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou estrutura filamentosa. Células pequenas acarretam o entupimento rápido de quaisquer sistemas de filtração em grandes volumes.

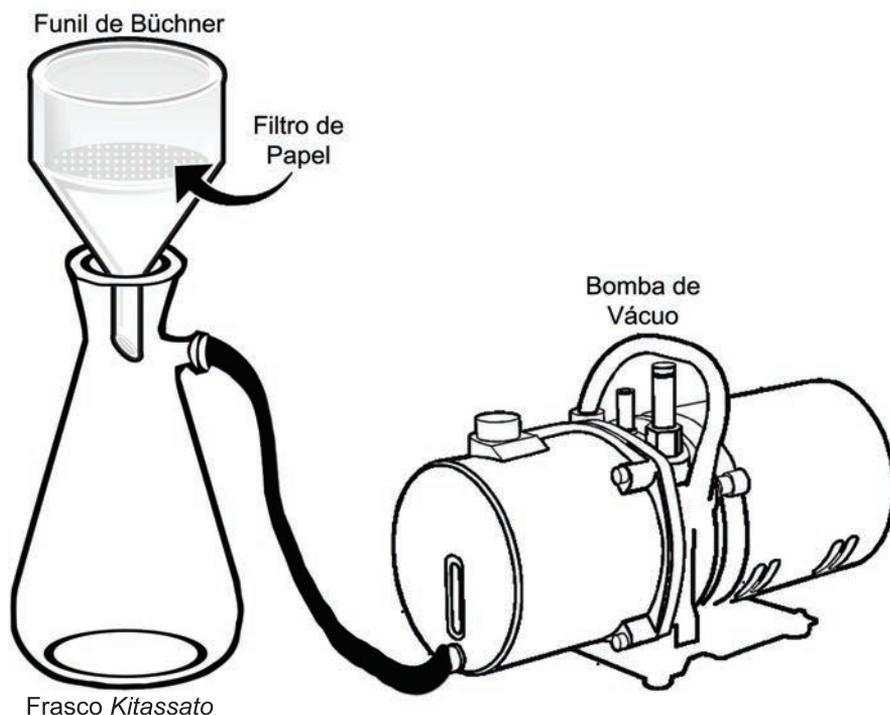


Figura 5.4. Sistema de filtração utilizado para microalgas.

A filtração é um processo bastante eficiente e prático quando se deseja concentrar pequenos volumes de microalgas. A *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) é uma das espécies de microalgas que apresenta características favoráveis a esse processo, principalmente por ser filamentosa. Entretanto, a maioria das microalgas destinadas à produção de biocombustíveis pertence a gêneros (por exemplo, *Nannochloropsis* ou *Chlorella*) nos quais as espécies são unicelulares e com tamanho inferior a $4\ \mu\text{m}$, o que dificulta a separação de células de líquidos utilizando o processo de filtração de maneira eficiente (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

O custo do equipamento de filtração estará diretamente relacionado à área de filtração, sendo normalmente desejável obter uma elevada velocidade global de filtração. O filtro

mais apropriado para qualquer operação é aquele que engloba os requisitos de eficiência com mínimo de custo global e os fatores mais importantes para a escolha de um filtro estão relacionados à resistência específica do bolo de filtração, a quantidade a se filtrar e a concentração dos sólidos (COULSON; RICHARDSON, 1965).

5.2.1 Microfiltração e ultrafiltração

A microfiltração e a ultrafiltração podem ser uma solução alternativa para a colheita da biomassa de espécies de microalgas frágeis (microfiltração) e isolamento (obtenção) de metabólitos produzidos (ultrafiltração). Os processos de microfiltração e ultrafiltração podem ser utilizados tanto para colheita da biomassa (microfiltração) ou isolamento e obtenção de produtos metabólitos (ultrafiltração), sendo uma solução alternativa para concentrar algumas espécies, não causando danos prejudiciais na composição e nas características das células (PETRUŠEVSKI et al., 1995).

Quando o método de recuperação por centrifugação da biomassa não é viável, devido à fragilidade das células da espécie de microalga, a microfiltração pode ser uma boa alternativa.

O desempenho de filtração pelo método de fluxo em “batelada” de filtrações para aumentar a concentração foi avaliada. A análise de custo foi estimada com base nos dados de um fotobiorreator de membrana em grande escala. Os resultados gerais sugerem que a microfiltração submersa para a colheita de microalgas é economicamente viável para concentrar células de *C. vulgaris* e *P. tricornutum* (BILAD et al., 2012b).

A microfiltração é um método possível caso o consumo de energia seja otimizado, tendo em conta o custo total de todo o processo e o valor do produto final. A dinâmica da microfiltração foi estudada por Rios e colaboradores (2011), consistindo o equipamento em um parafuso monobloco da bomba utilizado especificamente com microalgas para minimizar o

cisalhamento das células. A bomba do motor é regulada a uma frequência adequada para controlar a pressão da membrana constante durante todo experimento. Quatro diferentes membranas comerciais feitas pela KMPT foram testadas: duas de cerâmica (Al_2O_3), com poros de tamanho médio de 0,5 μm e 2,0 μm , respectivamente, e duas placas poliméricas feitas em Teflon comum (Politetrafluoretileno, PTFE) com tamanho médio de poro de 0,5 μm e 1 μm , respectivamente. Cada membrana tem uma área de filtração de 0,023 m^2 . Permeabilidades da membrana à água foram testadas antes do uso e depois de cada lavagem, sendo a taxa de limpeza avaliada pela medida do fluxo de recuperação. Todos os experimentos foram conduzidos com fluxo de recirculação na taxa de 200 $L h^{-1}$ e uma área de membrana efetiva de 0,023 m^2 .

A microfiltração de microalgas pelo uso de sistemas dinâmicos fornece aumento no desempenho do processo de concentração de células. O efeito do incrustamento prejudica o desempenho da microfiltração. Para uma estirpe de microalga diatomácea *Phaeodactylum Tricornutum* Bohlin, de forma fusiforme, com 40 μm de comprimento e 3,5 μm largura na concentração de $3,94 \times 10^6$ células mL^{-1} , as membranas de cerâmica com tamanho médio de poro de 2 μm ofereceram completa rejeição ao fluxo e razoável permeabilidade usando aumento rotacional (RIOS; CLAVERO; SALVADO et al., 2011). Para a colheita de microalgas em grande escala, o principal desafio na tecnologia de ultrafiltração por membrana e reciclagem do meio de cultura utilizado é o incrustamento da membrana e a falta de conhecimento da natureza química e das propriedades moleculares desse incrustamento. Para determinar o mecanismo de bioincrustamento da membrana de concentração de células de microalgas, Zhang e colaboradores (2013) utilizaram um equipamento feito de tubos de fibra de polivinilcloreto (PVC) com membrana de ultrafiltração. Para *Chlorella zofingiensis* cultivada em fotobiorreator de placa plana, os

autores observaram que na ultrafiltração a fração de carboidratos dos compostos orgânicos dissolvidos é a principal causa de incrustação na colheita.

5.3 Colheita por Centrifugação

No cultivo de microalgas em larga escala não existe um método de colheita único para solucionar todos os problemas de recuperação da biomassa. A centrifugação é um processo simples que consiste em submeter o cultivo de microalgas em um tanque tubular denominado de centrífuga a ciclos sequenciais com maior força gravitacional para aumentar a taxa de sedimentação (MOLINA GRIMA; FERNANDEZ; MEDINA, 2004; CHISTI, 2007b). Esse procedimento pode ser aplicado para concentração da biomassa sem adição de produtos químicos, conservando suas características originais (LOURENÇO, 2006). Embora a centrifugação tenha sido relatada como um processo de colheita oneroso em tempo e energia (HORIUCHI; OHBA; TADA et al., 2003). Esse fato ocorre devido ao tamanho pequeno, à baixa concentração no meio e à estabilidade elétrica das células. Entretanto, a colheita de microalgas por centrifugação é uma técnica bem sucedida em escala de laboratório, quando pequenos volumes de biomassa são produzidos. Uma das vantagens do processo de centrifugação que tornou essa operação uma das principais na separação da biomassa de microalgas está relacionada a fácil limpeza e disponibilidade de máquinas esterilizáveis, visando manter a biomassa sem alterações em suas características pela influência de contaminantes (WHITELAM et al., 1983; RICHMOND, 2004b).

Porém, para cultivos em grande escala, a centrifugação necessita de altos investimentos na aquisição do equipamento e envolve gastos de energia significativos. Além disso, esse processo pode acarretar perdas de células após a agregação das

mesmas ao fundo dos tubos e depende muito da espécie cultivada, da densidade celular, da força centrífuga agregada e do volume. Em escalas comerciais, para produtos de alto valor agregado, essa técnica se torna viável, mesmo com os altos custos de energia envolvidos no funcionamento do sistema e pela dificuldade de processar grandes volumes de cultivo. O poder de consumo de energia para centrifugação do meio de cultivo contendo a microalga tem sido estimado em 8 kW h m^{-3} (MOLINA GRIMA et al., 2003b; VANDAMME; PONTES; GOIRIS et al., 2011).

A colheita automatizada por centrifugação pode processar volumes relativamente grandes e com rapidez e, ainda, apresentar recuperação de quase 100% da biomassa com nível de umidade aceitável para manter a qualidade do produto final. Com base em danos celulares aparentes e na viabilidade do produto, a centrifugação de alta velocidade foi considerada o método de colheita de microalgas mais adequado para prolongar o tempo de prateleira dos produtos concentrados para atender os requisitos de incubadoras e berçários de cultivos marinhos (HEASMAN et al., 2000). Molina Grima e colaboradores (2003a) concluíram que existem várias opções para recuperar e processar a biomassa e obter metabólitos produzidos por microalgas. Esses autores sugerem que para a escala industrial de produtos de alto valor comercial, a centrifugação parece ser a metodologia adequada de recuperação da biomassa do meio líquido de cultivo. O procedimento de centrifugação deve ser precedido de floculação para melhor recuperação da biomassa.

A falta de tecnologias eficientes e de baixo custo para a colheita de grandes quantidades de biomassa de microalgas é um grande obstáculo para a comercialização de biocombustíveis derivados de algas. Coward e Lee (2013) demonstraram a eficácia de uma máquina colhedora construída para a colheita, concentração e separação física de células de microalgas em

suspensão nos cultivos. As análises sobre a economia dessa colheita revelou que o processo consome apenas 0,015 kWh m⁻³, proporcionando uma relação favorável de custo-benefício no cultivo de microalgas.

5.4 Desidratação e Conservação da Biomassa de Microalgas

A desidratação da cultura de microalgas é um grande gargalo para o processamento em escala industrial de microalgas para a produção de biodiesel, tornando, assim, os combustíveis à base de microalgas economicamente menos atraentes.

De certa forma, o uso de pasta úmida da biomassa algal é preferível para recuperar metabólitos porque nesse esquema, a priori, a etapa de secamento adiciona custos significativos no custo de produção. Neste item do tópico colheita são citados os procedimentos usuais para manter a viabilidade das características da biomassa algal. Esse processo é importante porque o uso/comercialização da biomassa pode ser de dias até anos. A conservação pode ser em refrigeração com baixas temperaturas na faixa de 4-8°C.

A descrição a seguir de alguns procedimentos baseia-se em diversos trabalhos (MOLINA GRIMA; BELARBI; ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2003a; LOURENÇO, 2006; MOLINA GRIMA; FERNANDEZ; MEDINA, 2004).

5.4.1 Secadores solares para extração da água da biomassa de microalgas

O nível de umidade da biomassa algal deve ser aceitável para manter a qualidade e integridade de suas propriedades no produto final. A colheita por gravidade da sedimentação deixa, geralmente, uma biomassa mais úmida do que no caso de recuperação por centrifugação. Se a desidratação é requerida, isso

pode influenciar no custo econômico do produto, porque a secagem ou desidratação térmica é muito mais cara do que a retirada mecânica de água.

5.4.2 Congelamento da biomassa de microalgas

No procedimento de congelamento, o cultivo é previamente concentrado e, embora ocorra morte das células, as características químicas (pigmentos e ácidos graxos) não são alteradas significativamente. Como ocorre ruptura das células pela formação de cristais de gelo, o material intracelular pode ser liberado. O material algal após a floculação e a centrifugação pode ser congelado.

5.4.3 Secagem da biomassa de microalgas por atomização

A secagem por atomização é aplicada a qualquer produto possível de ser bombeado, como exemplos podem ser citadas emulsões, pastas, soluções e suspensões nas indústrias farmacêutica de antibióticos e derivados, vacinas, vitaminas e fármacos em geral. A técnica de secagem por nebulização (*spray drying*) tem sido amplamente aplicada na obtenção de extratos secos com melhores características biotecnológicas e maior concentração de constituintes com atividade biológica. As características físico-químicas dos produtos produzidos por aspersão são influenciadas por fatores relacionados ao processo, à formulação, ao material de entrada e ao equipamento. A secagem por atomização é importante para o armazenamento de coprodutos da biomassa de microalgas. Desmorieux e colaboradores (2006) estabeleceram a isotérmica de sorção através de diferentes métodos de secagem de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) a 25°C e 40°C, visando manter as propriedades terapêuticas da biomassa. Oliveira e colaboradores (2010) demonstraram

que na condição ótima de secagem, a 55°C, e à espessura das amostras úmidas na faixa de 3-7 mm, a biomassa de *Spirulina platensis* (*Arthrospira* sp.) apresentou percentual de perda da ficocianina próximo a 37% e os valores de ácido tiobarbitúrico de 1,5 mg⁻¹. Nessa condição de secagem, a composição de ácidos graxos da microalga *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à biomassa fresca. O perfil lipídico do produto seco apresentou alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados (34,4%), especialmente o ácido gamalinolênico (20,6%).

Os secadores por nebulização, mais conhecidos por *spray dryers*, têm como princípio básico a maximização da área de troca de calor e massa durante a secagem. Essa técnica pode ser aplicada a qualquer material com comportamento líquido, por exemplo, pastas, lamas, suspensões, soluções e cultivos de microalgas. Um dos fatores primordiais para uma eficiente secagem está na operação de atomização.

No caso da produção de pigmentos e outros compostos farmacológicos ou nutracêuticos das microalgas, recomenda-se aplicar a técnica do *spray drying* para conservação das propriedades organolépticas da biomassa. No armazenamento das células carotenizadas da microalga *Haematococcus pluvialis*, o melhor resultado foi obtido com a biomassa seca por atomização a 180°C/110°C e armazenadas a -21°C em nitrogênio líquido, com degradação da astaxantina inferior a 10% após nove semanas (RAPOSO et al., 2012).

5.4.4 Secagem da biomassa de microalgas por liofilização

A liofilização é um processo que se caracteriza pela retirada da água do produto sem submetê-lo a altas temperaturas. No processo de liofilização, o produto, após uma etapa de preparo (retirada da umidade), é congelado a temperaturas de -40°C e

colocado em câmaras de alto vácuo. Com o aumento progressivo da temperatura e a manutenção da condição de baixíssima pressão (vácuo), atinge-se a temperatura necessária para obter a saída da água do produto por sublimação. Dessa forma, o produto não é exposto a altas temperaturas e, conseqüentemente, não ocorre a degradação do valor nutricional.

Nos procedimentos de secamento/desidratação para a água são utilizados os fatores físicos e químicos que têm ação na retirada da água da biomassa de microalgas. Pode ocorrer escurecimento e alteração dos pigmentos durante a secagem da biomassa de microalgas, assim como degradações de metabólitos por aquecimento e devido à ação de enzimas. A escolha adequada do procedimento de desidratação é fundamental para a obtenção de produtos finais adequados, de boas características e estáveis quanto à conservação. O secador por nebulização é um equipamento bastante utilizado na secagem de alimentos por apresentar: baixa deterioração/alteração de nutrientes, aroma, sabor e coloração; alta eficiência energética e produtividade; efetivo controle das variáveis; produtos na forma de pó, com forma, tamanho e densidades controladas pelas condições do processo; capacidade de microencapsular, mantendo as propriedades bioquímicas do produto.

A metodologia de liofilização permite conservar as características organolépticas da biomassa algal, pois promove a retirada total de umidade das células a baixas temperaturas (aproximadamente -40°C). A retirada da água é feita por meio de vácuo das amostras congeladas em um equipamento denominado liofilizador. Esse método foi testado para conservar espécies de microalgas com a adição de crioprotetores.

A biomassa de microalgas liofilizadas tem as mais diversas aplicações. A adição de microalgas *Nannochloropsis oculata* liofilizadas ao óleo de soja inibiu significativamente a oxidação e foi positivamente correlacionada ao aumento na estabilidade do óleo. A adição de 5,0% de pó de microalgas liofilizadas (massa/

massa) aumentou os valores do índice de estabilidade do óleo de soja para mais do dobro em ambas as temperaturas (120°C e 130°C). Os fatores contribuintes para esse aumento do índice de estabilidade do óleo podem ser os altos conteúdos de compostos fenólicos e α -tocoferóis da *N. oculata* (LEE et al., 2013). Os autores sugeriram que *N. Oculata* tem potencial para ser utilizada como aditivo em óleo de cozinha, aumentando a vida útil e o valor nutricional do produto e para reduzir a produção de radicais livres a partir da oxidação de lipídeos, quando o óleo é usado em processos de cozimento a altas temperaturas.

Considerações Finais

Existem várias opções de colheita da biomassa de microalgas, todavia, deve-se considerar aspectos econômicos, ambientais e a aplicação da biomassa, pois existem processos com altos custos energéticos para a separação do sólido-líquido.

O elevado custo na separação líquido-massa sólida de biomassa no cultivo de microalgas em escala industrial/comercial é um gargalo que tem contribuído para limitar a expansão desse sistema de produção.

Os métodos de colheita da microalga variam de acordo com a espécie cultivada. Na maioria dos trabalhos consultados, verifica-se que *Chlorella vulgaris* foi avaliada quanto à floculação, escolha do coagulante/floculante, método de colheita e aplicação da biomassa como produto final, que pode ser empregada desde a alimentação humana e animal até à produção de biocombustíveis e substâncias com alto valor agregado.

Na colheita, o uso de tecnologias não pode envolver gastos energéticos altos, todavia, um aspecto a ser considerado é a aplicação final da biomassa, podendo ser produto final com alto valor agregado. Nesses casos, a centrifugação parece ser o procedimento preferido e para melhorar a eficiência da recuperação a pré-coagulação/floculação é uma etapa fundamental.

Quando a espécie de microalga apresenta fragilidade celular, a filtração é recomendada e no caso de metabólitos a recuperação de pastas úmidas é preferível para reduzir custos adicionais com a desidratação.

Embora existam métodos eficientes de colheita, a otimização para cada espécie de microalga e a aplicação do produto ainda é um desafio a ser trabalhado para reduzir custos e viabilizar o sistema de produção. A colheita de biomassa de microalgas com o pré-tratamento com floculantes de origem microbiana tem, teoricamente, viabilidade econômica.

A desidratação e o armazenamento da biomassa de microalgas, em condições adequadas para comercialização e os diversos usos biotecnológicos, é um grande gargalo para o processamento em escala industrial de microalgas. Fato, este, devido à natureza diluída dos cultivos de microalgas, elevando muito o custo de produção.

Referências

- AHMAD, A. L. et al. Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 173, n. 3, p. 879-882, 2011.
- BAJAJ, I.; SINGHAL, R. Flocculation properties of poly(γ -Glutamic Acid) produced from *Bacillus subtilis* isolate. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 4, n. 5, p. 745-752, 2011.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- BENEMANN, J.; OSWALD, W. **Systems and economic analysis of microalgae ponds for conservation of carbon dioxide to biomass**. Pittsburgh: Pittsburgh Energy Technology Center, Department of Energy, 1996. (Quarterly Technical Progress Report, 4).
- BEUCKELS, A. et al. Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 54, p. 107-114, 2013.

- BILAD, M. R. et al. Simultaneous cultivation and pre-harvesting of microalgae in a lab-scale membrane photobioreactor (MPBR). **Procedia Engineering**, Maryland, v. 44, p. 712-713, 2012a.
- BILAD, M. R. et al. Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 111, p. 343-352, 2012b.
- BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; SUKENIK, A. Flocculation of microalgae with cationic polymers: effects of medium salinity. **Biomass**, London, v. 17, n. 1, p. 65-76, 1988.
- BITTON, G.; FOX, J. L.; STRICKLAND, H. G. Removal of algae from Florida lakes by magnetic filtration. **Applied Microbiology**, Washington, v. 30, n. 6, p. 905-908, 1975.
- BLACKADDER, D. A.; NEDDERMAN, R. M. **Manual de operações unitárias**. São Paulo: Hemus, 1982.
- BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, New York, v. 41, n. 11, p. 2301-2324, 2007.
- BORGES, L. et al. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35 p. 4449- 4454, 2011.
- BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 4, n. 3, p. 267-279, 1992.
- BOSMA, R. et al. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 15, n. 2, p. 143-153, 2003.
- BRIASSOULIS, D. et al. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 6768-6777, 2010.
- CASTRILLO, M. et al. High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 128, p. 324-329, 2013.

- CHEN, L. et al. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. **Bioresource Technology**, Essex, v. 133, p. 9-15, 2013.
- CHENG-WU, Z. et al. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). **Aquaculture**, Stirling, v. 195, n. 1-2, p. 35-49, 2001.
- CHENG, Y. L. et al. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 82-87, 2011.
- CHINI ZITTELLI, G. et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-3, p. 299-312, 1999.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 6, p. 686-702, 2011.
- COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F. **Tecnologia química**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1965. v. 3.
- COWARD, T.; LEE, J. G. M.; CALDWELL, G. S. Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 135-144, 2013.
- DANQUAH, M. K. et al. Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 151, n. 1-3, p. 73-78, 2009.
- DE GODOS, I. et al. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 2, p. 923-7, 2011.
- DESMORIEUX, H.; DECAEN, N. Convective drying of *Spirulina* in thin layer. **Journal of Food Engineering**, London, v. 77, n. 1, p. 64-70, 2006.
- DIVAKARAN, R.; SIVASANKARA PILLAI, V. N. Flocculation of algae using chitosan. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 14, n. 5, p. 419-422, 2002.

EISENBERG, D. M. et al. Algal bioflocculation and energy-conservation in microbial sewage ponds. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p. 429-448, 1981.

FENG, D.; XU, S. Characterization of bioflocculant MBF3-3 produced by an isolated *Bacillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 1627-1632, 2008.

FERRIOLS, V. M. E. N.; AGUILAR, R. O. Efficiency of various flocculants in harvesting the green microalgae *Tetraselmis tetrahele* (Chlorodendrophyceae: Chlorodendraceae) **AAFL Bioflux**, Romania, v. 5, n. 4, p. 265-273, 2012.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a feedstock for biofuel**. New York: Springer, 2011.

GRANADOS, M. R. et al. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, Essex, v. 118, p. 102-110, 2012.

GUDIN, C.; CHAUMONT, D. Cell fragility - the key problem of microalgae mass-ocultivation in closed photobioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 38, n. 2-3, p. 145-151, 1991.

HARITH, Z. T. et al. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 21, p. 5971-5978, 2009.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HEASMAN, M. et al. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 8-9, p. 637-659, 2000.

HORIUCHI, J. I. et al. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 95, n. 4, p. 412-415, 2003.

JANČULA, D.; MARŠÁLKOVÁ, E.; MARŠÁLEK, B. Organic flocculants for the removal of phytoplankton biomass. **Aquaculture International**, London, v. 19, n. 6, p. 1207-1216, 2011.

JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 1406-1413, 2010.

KIM, D. G. et al. Optimization of flocculation conditions for *Botryococcus braunii* using response surface methodology. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 25, n. 3, p. 875-882, 2013.

KIM, D. G. et al. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 3, p. 3163-8, 2011.

KNUCKEY, R. M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, Essex, v. 35, n. 3, p. 300-313, 2006.

KUMAR, M. V. V. A review of chitin and chitosan applications **Reactive & Functional Polymers**, Amsterdam, v. 46, p. 1-27, 2000.

LEE, S. J. et al. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 14-18, 1998.

LEE, A. K.; LEWIS, D.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 21, n. 5, p. 559-567, 2009.

LEE, A. K.; LEWIS, D.; ASHMAN, P. J. Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. **Chemical Engineering Research and Design**, Elmsford, v. 88, n. 8, p. 988-996, 2010.

LEE, J. et al. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 131, p. 195-201, 2013.

LEE, Y. L. et al. Freeze-dried microalgae of *Nannochloropsis oculata* improve soybean oil's oxidative stability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 22, p. 9675-9683, 2013.

LI, X. Y.; YANG, S. F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. **Water Research**, New York, v. 41, n. 5, p. 1022-1030, 2007.

LIAN, B. et al. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4825-4831, 2008.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. Campinas: Átomo, 2010. v. 3.

LIU, J. et al. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 98, 2013.

LOURENÇO, S. O. Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 79, n. 1-2, p. 149-173, 2004.

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

MAGESH, P. D. et al. Microalgal flocculation of *Chlorella vulgaris* by alteration of pH. **International Journal on Applied Bioengineering**, Chennai, v. 3, n. 1, p. 30-34, 2009.

MANDAL, A. K. et al. Partial characterization and flocculating behavior of an exopolysaccharide produced in nutrient-poor medium by a facultative oligotroph *Klebsiella* sp. PB12. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 115, n. 1, p. 76-81, 2013.

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

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003a.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003b.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R. Downstream processing of cell-mass and products. In: RICHAMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, 2004. p. 215-253.

MORALES, J.; DELANOUE, J.; PICARD, G. Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. **Aquacultural Engineering**, Essex, v. 4, n. 4, p. 257-270, 1985.

OH, H. M. et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 15, p. 1229-1234, 2001.

OLIVEIRA, E. G. et al. Optimisation of *Spirulina platensis* convective drying: Evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 1572-1578, 2010.

OSTERMAIER, V. et al. Stability of toxin gene proportion in red-pigmented populations of the cyanobacterium *Planktothrix* during 29 years of re-oligotrophication of Lake Zurich. **BMC Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 100, 2012.

PAPAZI, A.; KOTZABASIS, K. Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds-Exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 129, n. 4, p. 706-716, 2007.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 349-355, 2010.

PETRUŠEVSKI, B. et al. Tangential flow filtration: A method to concentrate freshwater algae. **Water Research**, New York, v. 29, n. 5, p. 1419-1424, 1995.

POELMAN, E.; DEPAUW, N.; JEURISSEN, B. Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae. **Resources Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 1-10, 1997.

RAPOSO, M.; MORAIS, A.; MORAIS, R. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 1253-7, 2012.

RENAULT, F. et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes-an eco-friendl. **European Polymer Journal**, New York, v. 45, n. 5, p. 1337-1348, 2009.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, 2004.

- RICHMOND, A.; CHENG-WU, Z. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 259-269, 2001.
- RICHTER, C. A.; AZEVEDO NETTO, J. M. **Tratamento de água: tecnologia atualizada**. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.
- RIOS, S. D. et al. Dynamic microfiltration in microalgae harvesting for biodiesel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 50, n. 4, p. 2455-2460, 2011.
- SALIM, S. et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 23, p. 849-855, 2011.
- SANDBANK, E.; SHELEF, G.; WACHS, A. M. Improved electroflotation for the removal of suspended solids from algal pond effluents. **Water Research**, New York, v. 8, n. 9, p. 587-592, 1974.
- SHARMA, B. R.; DHULDHOYA, N. C.; MERCHANT, U. C. Flocculants-an ecofriendly approach. **Journal of Polymers and the Environment**, New York, v. 14, n. 2, p. 195-202, 2006.
- SHELEF, G.; SUKENIK, A.; GREEN, M. **Microalgal harvesting and processing: a literature review**. Golden: US Department of Energy, 1984.
- SILVA, H. R. et al. Flocculation of microalgae in the means of cultivation using cationic starch of the cassava. In: INTERNATIONAL IUPAC CONFERENCE ON GREEN CHEMISTRY/INTERNATIONAL OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 4., 2012, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Química, 2012.
- SILVA, H. R. D. **Aplicação de métodos para concentração da biomassa de microalgas cultivadas em meio líquido**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- SING, S. F. et al. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Washington, v. 18, n. 1, p. 47-72, 2013.
- SINGH, R. T. et al. Novel biodegradable flocculants based on polysaccharides. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 7, p. 798-803, 2000.

ŞIRIN, S. et al. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornerutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 24, n. 5, p. 1067-1080, 2012.

SUKENIK, A.; BILANOVIC, D.; SHELEF, G. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 15, p. 187-199, 1988.

TONHATO, A.; MACAGNAN, D. C.; SEBASTIEN, N. Y. Tanino vegetal como floculante alternativo para separação de biomassa de microalgas. In: SIMPÓSIO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – SITEC, MOSTRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – MIT, 2011, Cascavel. **Anais...** Cascavel, 2011.

UDUMAN, N. et al. A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 174, n. 1, p. 249-257, 2011.

VANDAMME, D. et al. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 525-530, 2010.

VANDAMME, D. et al. Evaluation of electro-coagulation–flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 6, 2011.

WAN, C. et al. Biofloculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 135, p. 207-212, 2013.

WHITELAM, G. C.; LANARAS, T.; CODD, G. A. Rapid separation of microalgae by density gradient centrifugation in Percoll. **British Phycological Journal**, London, v. 18, n. 1, p. 23-28, 1983.

WU, Z. et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, Barking, v. 110, p. 496-502, 2012.

WYATT, N. et al. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 109, n. 2, p. 493-501, 2012.

XIE, S. et al. Efficient coagulation of microalgae in cultures with filamentous fungi. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 28-33, 2013.

XU, L. et al. A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 21, p. 10047-10051, 2011.

XU, L. et al. Development of an efficient electroflocculation technology integrated with dispersed-air flotation for harvesting microalgae. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 85, n. 11, p. 1504-1507, 2010.

YAHY, H.; ELMALEH, S.; COMA, J. Algal flocculation-sedimentation by pH increase in a continuous reactor. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 259-267, 1994.

YAN, G.; YU, J.; WANG, Y. The effects of pH and temperature on orthophosphate removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 18, n. 8, p. 893-896, 1996.

ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, Essex, v. 114, p. 529-535, 2012.

ZHANG, W. et al. Characterization of dissolved organic matters responsible for ultrafiltration membrane fouling in algal harvesting. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 223-229, 2013.

ZHENG, H. et al. Harvesting of microalgae by flocculation with poly (γ -glutamic acid). **Bioresource Technology**, Essex, v. 112, p. 212-220, 2012.

CAPÍTULO 6

PRINCIPAIS PRODUTOS DA BIOMASSA ALGAL E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Diva Souza Andrade

Arnaldo Colozzi Filho

Carmen Luísa Barbosa Guedes

Fernanda de Almeida Fin de Lima

Gabriela da Silva Machineski

Maria Aparecida de Matos

Helder Rodrigues da Silva

Introdução

As microalgas são reconhecidas como um dos organismos mais antigos no planeta Terra. Esse termo se refere a todo microrganismo unicelular e multicelular que realiza fotossíntese oxigênica, incluindo os procariotos (Cyanophyceae) e os eucariotos (Chlorophyta). O interesse na produção de biomassa de microalgas para diversas aplicações iniciou-se a mais de cem anos, segundo Lourenço (2006), que cita diversas revisões sobre o histórico do cultivo de microalgas. O primeiro relato sobre produção de H_2 por microalgas foi apresentado por Jackson e Ellms, em 1896, tornando-se assunto de pesquisa científica em 1940 (BENEMANN, 2000). Spolaore e colaboradores (2006) reportaram que o uso de microalgas por humanos data de 2000 anos atrás e que foram os chineses os primeiros a utilizarem *Nostoc* para sobreviverem à fome. As pesquisas sobre a produção em larga escala da biomassa de microalgas começaram por volta de 1960 e o número de artigos científicos relacionados a fotobiorreatores no período de 1990 a 2010 teve crescimento linear, de acordo com dados da revisão de Grobbelaar (2010).

No Brasil, o desenvolvimento de pesquisas com microalgas voltadas à produção em larga escala com objetivos em aplicações biotecnológicas ainda é, relativamente, recente. No Rio Grande do Sul, desde 1998 o Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande desenvolve trabalhos em escala-piloto com microalgas do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*) como fonte de proteínas (MORAIS et al., 2009; COSTA et al., 2011) e, mais tarde, iniciou-se a utilização na aquicultura e a extração de óleo visando à produção de biocombustível. No Paraná, no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a partir de 2009, um projeto de pesquisa foi conduzido, em parceria com a Companhia Paranaense de Energia (Copel), com o objetivo de desenvolver tecnologias para a produção de óleo e coprodutos da biomassa de microalgas (IAPAR, 2013).

Entre as tecnologias a serem implantadas em futuro próximo para a produção de biodiesel no Brasil foi sugerido o desenvolvimento de sistemas de cultivos de microalgas com a utilização de áreas com altas taxas de luminosidade, reciclagem de resíduos e captura de CO₂ oriundos de termoelétricas e unidades de fermentação de cana-de-açúcar (CARIOCA, 2010).

O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens, como os meios de cultivo, que podem ser inorgânicos ou orgânicos, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de metabólitos específicos como, por exemplo, ácidos graxos. Deve-se ainda considerar que a produção desses compostos pode ser influenciada por fatores ambientais como intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de nutrientes (RADMANN et al., 2008; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2011).

A composição da biomassa de microalgas contém em maiores quantidades: pigmentos, carboidratos, proteínas e lipídeos, que variam conforme o gênero, a espécie ou a estirpe. A caracterização e os estudos em relação ao manejo, desde o cultivo até a obtenção do composto de acordo com a aplicação da microalga, são a base da viabilidade da aplicação biotecnológica.

Diversas espécies de microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, tais como ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, proteínas e pigmentos, além das inúmeras aplicações biotecnológicas da biomassa de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; DERNER et al., 2006). Nas células de *Chlorella*, a substância bioativa mais importante é o β -1,3 glucano (SPOLA-ORE et al. 2006). As espécies do gênero *Chlorella* têm ampla distribuição e são bastante adaptadas ao cultivo em águas salobras de resíduos agroindustriais e às diversas condições climáticas. Essas espécies têm sido utilizadas na produção industrial em mais de 70 empresas, sendo as duas maiores a

Taiwan Chlorella Manufacturing, no Japão, e a *Roquette Klötze GmbH & Company*, na Alemanha, com produção aproximada de 400 t e 150 t de biomassa seca por ano, respectivamente (SPOLAORE; JOANNIS-CASSAN; DURAN et al., 2006). Singh e Gu (2010) citam diversos trabalhos que fornecem o perfil de 23 companhias que cultivam microalgas e os vários aspectos da utilização industrial dos produtos obtidos.

Para a obtenção de corantes e proteínas, principalmente, os cultivos em tanques para produção de biomassa de microalgas em águas continentais estão limitados às espécies de *Haematococcus*, *Arthrospira* e *Chlorella* (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). As principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas são enriquecimento de rações para peixes e na dieta humana, quanto aos lipídeos, existe a possibilidade de uso para a produção de biodiesel (FEOFILOVA et al., 2010).

Em relação à presença de pigmentos, semelhante ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalga apresenta sua própria combinação de substâncias com propriedades corantes e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa de microalgas são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas, também denominadas ficobiliproteínas (DERNER; OHSE; VILLELA et al., 2006).

Nesse contexto, a abordagem dos próximos tópicos sobre os principais produtos da biomassa de microalgas tem ênfase nos pigmentos (compostos valorados), carboidratos, proteínas, lipídeos e em suas aplicações biotecnológicas, bem como nas proteínas como suplementos alimentares. Também é enfatizado o papel desses microrganismos fotossintetizantes na produção de energia e como agentes de remediações ambientais pela fixação do CO₂ e, especialmente, as cianobactérias como fixadoras de N₂ atmosférico e biofertilizantes.

6.1 Pigmentos e suas Aplicações

Existem três classes de pigmentos encontrados na biomassa de microalgas: ficobilinas, clorofilas e carotenoides, sendo que as ficobilinas são do grupo das proteínas e os dois últimos do grupo dos lipídeos. Após uma série de pesquisas relacionadas ao uso desses pigmentos de microalgas em diversas áreas, como produção industrial de alimentos, nutracêuticas e farmacêuticas, foi constatado que esses microrganismos apresentam grande potencial nesse segmento (BOROWITZKA, 1999; MARGALITH, 1999; LA FUENTE et al., 2006; LOURENÇO, 2006; BLANCO et al., 2007; DEL CAMPO et al., 2007). Nesses trabalhos, a viabilidade econômica foi abordada e ressaltada a necessidade de seleção de estirpes, otimização dos processos de cultivo e valorização dos coprodutos da biomassa de microalgas.

Os principais pigmentos fotossintéticos, clorofilas, carotenoides e ficobilinas, com suas respectivas cores, de acordo com observação visual e a distribuição nos grupos de organismos fotossintéticos, são apresentados na Tabela 6.1.

As microalgas, categorizadas como microrganismos fotossintetizantes, têm habilidade para produzir diferentes proporções de pigmentos em resposta a diferentes condições de iluminação. É possível obter a partir das mesmas, clorofilas com características espectrais variando de verde-amarelo a azul-esverdeado, além de seus derivados produzirem cores laranja até vermelhas, em condições químicas drásticas (Tabela 6.1) (RANGEL, 2000).

O cultivo em massa de microalgas tem recebido bastante atenção nas últimas décadas para diversas aplicações. Contudo, a produção desses microrganismos em escala comercial para uso, por exemplo, de pigmentos, ainda é restrito a algumas espécies, principalmente dos gêneros *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Muriellopsis* e *Spirulina*, sendo que a massa seca desta

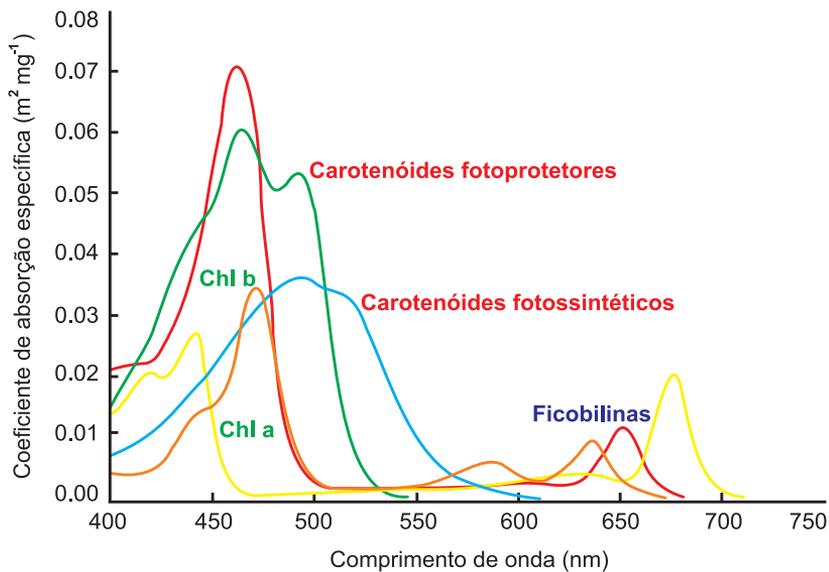
última é uma das maiores fontes de clorofila *in natura* (BECHTOLD et al., 2009). Todavia, as possibilidades de aplicação de pigmentos e o número de espécies de microalgas produtoras desses compostos ainda não estudadas ou utilizadas comercialmente podem ser muito maiores do que se supõe.

Os carotenoides são utilizados na indústria como corantes naturais, aditivos em ração para animais e nutracêuticos (CORDERO; COUSO; LEÓN et al., 2011), destacando-se o β -caroteno e a astaxantina (LOURENÇO, 2006).

Tabela 6.1. Pigmentos fotossintéticos, suas respectivas cores e distribuição nos diversos organismos.

Pigmentos fotossintéticos			
Pigmento	Categoria	Cor	Distribuição
Clorofilas	<i>a</i>	Verde	Plantas, algas e cianobactérias
	<i>b</i>		Plantas e algas verdes
	<i>c</i>		Algas castanhas e diatomáceas
	<i>d</i>		Algas vermelhas
Carotenoides	Carotenos	Laranja	Microrganismos fotossintéticos, exceto as cianobactérias
	Xantofilas	Amarela	Algas castanhas e diatomáceas
Ficobilinas	Ficoeritrina	Vermelha	Algas vermelhas e cianobactérias
	Ficocianina	Azul	

As ficobilinas são importantes marcadores fluorescentes e, assim como os carotenóides totais e clorofilas, apresentam diferentes espectros de absorção que são específicos para cada um desses pigmentos fotossintéticos (Figura 6.1).



Fonte: Weaver e Wrigley (1994).

Figura 6.1. Espectro de absorção dos principais pigmentos encontrados em algas.

Essas diferenças e especificidades na absorção permitem adequar metodologias na determinação de cada pigmento; como exemplo, na análise da clorofila *a*, *b*, *c*, feofitina e carotenóides totais são utilizados diversos comprimentos de onda como 480 nm, 510 nm, 630 nm e até 750 nm para as leituras. O uso de métodos de medida por fluorescência de clorofila para estudos de desempenho fotossintético e estresse é, atualmente, muito difundido em estudos da fisiologia e da ecologia de microalgas (BAKER, 2008).

6.1.1 Ficobilinas

As ficobilinas ou ficobiliproteínas representam um grupo de proteínas coloridas presentes nas cianobactérias (microrganismos procariotos) e nas microalgas eucariontes pertencentes ao filo Rhodophytas e Glaucophytas, com amplo espectro de aplicação biotecnológica (SEKAR et al., 2008b). Essas proteínas são solúveis em água e representam compostos de subunidades alfa e beta, sendo relativamente fáceis de isolar e purificar, porque compõem grande proporção das proteínas totais da célula. Elas representam 20% do peso total desses microrganismos e seus corantes podem ser utilizados como agentes fluorescentes em fármacos (SCHLUCHTER et al., 2002).

A importância metabólica desse pigmento se deve à capacidade do mesmo em captar energia solar nas regiões visíveis do espectro em que a clorofila possui baixa absorção e transferir sua energia para a clorofila, sendo os principais pigmentos acessórios das algas vermelhas e de algumas cianobactérias.

As ficobiliproteínas obtêm sua coloração dos cromóforos que, estruturalmente, são tetrapirróis lineares unidos covalentemente às apoproteínas. Os tetrapirróis não formam complexos com íons metálicos, porém, sendo não cíclicos, podem ser facilmente manipulados pelas apoproteínas para produzir uma série de características biológicas relevantes (CAÑIZALES-VILLANUEVA et al., 1998).

Ficobiliproteínas e ficobilissomas têm sido estudados há mais de 150 anos e o número de patentes é alto, com 297 registros apenas em 2008, sendo a maioria (122 registros) com base em aplicações como marcadores fluorescentes. No entanto, o número de cianobactérias e algas vermelhas produtoras desses pigmentos e já estudadas, ainda é pequeno (SEKAR et al., 2008a).

Para o aproveitamento desses compostos, é importante o desenvolvimento de metodologias de extração. Para extrair a

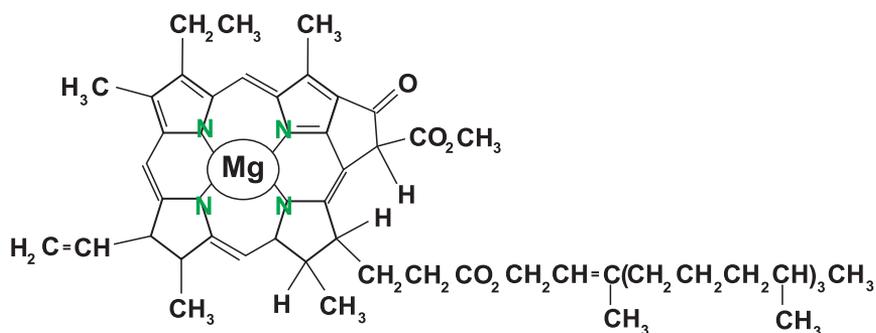
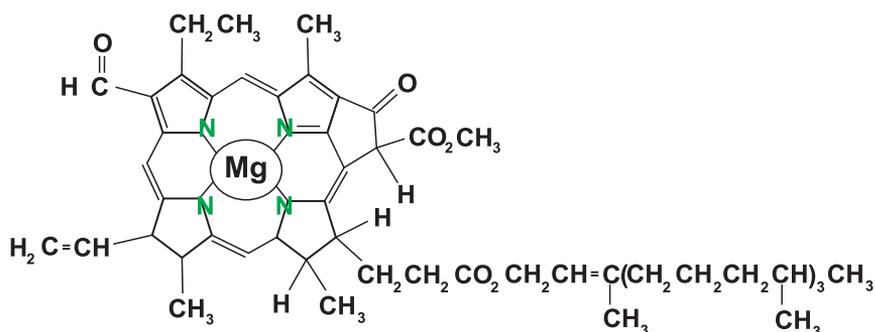
c-phycocianina, um pigmento azul solúvel em água, em cultivos de *Arthrospira platensis*, Zhu e colaboradores (2007) descreveram um método simples de extração utilizando *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria fixadora de N₂. No estudo de busca de patentes, Sekar e Chandramohan (2008a) citam que até 2008 foram encontradas 23 patentes sobre processos de extração e purificação de ficobiliproteínas.

As ficobiliproteínas possuem alto valor terapêutico como imunomodulador e, recentemente, têm-se aumentado o interesse pela habilidade desses compostos em reverter o fenômeno de multirresistência a fármacos de vários tipos de células tumorais, no entanto, seu uso no tratamento de câncer ainda é escasso. Ainda, as mesmas são utilizadas como reativos químicos fluorescentes, corantes em alimentos e cosméticos (VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2006).

6.1.2 Clorofilas nas microalgas

As clorofilas são pigmentos de ocorrência natural e podem ser encontradas no reino vegetal, em algas e em algumas bactérias fotossintéticas de ambiente aquático. São, praticamente, os únicos pigmentos naturais verdes e certamente os únicos em abundância, sendo produzidas bilhões de toneladas de clorofila por ano na terra e nos oceanos.

Estruturalmente, esses pigmentos são moléculas complexas, baseadas em um macrociclotetrapirrol, formadas por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel pirrólico. Os anéis estão ligados entre si por pontes metilênicas, sendo a estrutura pertencente à classe conhecida como porfirina. A molécula de clorofila contém um átomo de magnésio no seu interior, coordenado aos anéis. A ligação com o átomo de Mg é forte e proporciona rigidez à estrutura, permitindo que a molécula absorva energia do sol e não a perca por movimentos eletrônicos (Figura 6.2).

**Clorofila a****Clorofila b**

Fonte: Dailey (1990) e Gross (1991).

Figura 6.2. Estrutura química das clorofilas *a* e *b*.

No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico encontra-se esterificado por um álcool acíclico de cadeia longa, geralmente, “fitol”, conferindo à clorofila um caráter hidrofóbico (GROSS, 1991; LANFER-MARQUEZ, 2003).

A estrutura básica da clorofila mantém alto grau de insaturação e apresenta um circuito de duplas ligações conjugadas, que tem elevada capacidade de ligação com metal. Isso permite absorver a luz nas regiões do espectro visível, azul e vermelho, e refletir a luz que é percebida como verde. As clorofilas estão

ligadas de forma não covalente às proteínas e estão sempre acompanhadas de carotenoides que protegem a molécula da degradação (DAILEY, 1990; HENDRY et al., 1996).

As clorofilas são essenciais para o processo de fotossíntese, que converte energia da radiação solar em energia química e são moléculas sintetizadas constantemente e destruídas (foto-oxidação) em presença de luz, apresentando maior velocidade de decomposição em condições de alta intensidade luminosa. Não só a concentração total de clorofila, mas também a proporção entre os diversos tipos de clorofila mudam em função da intensidade luminosa. De maneira geral, a proporção entre clorofila *a* e *b* tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa (KRAMER et al., 1979).

As pesquisas sobre clorofilas têm recebido atenção há algum tempo, não apenas por sua importância no sistema biótico, mas também pelo seu potencial relevante como um pigmento natural em um âmbito ilimitado de aplicação como corante, especialmente as provenientes da biomassa de microalgas (COLYER et al., 2005; KITADA et al., 2009; HOSIKIAN et al., 2010; ABURAI et al., 2013). A cor verde intensa de clorofilas naturais sugere que elas podem estar disponíveis para serem utilizadas como corantes aditivos lipossolúveis em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e produtos de higiene pessoal. A maior parte da clorofila utilizada em mercados de corantes alimentares é proveniente de plantas terrestres, porém a instabilidade no isolamento das clorofilas naturais tem impedido maior utilização das mesmas como corante (SCHWARTZ et al., 1990; HENDRY; HOUGHTON, 1996). Para a clorofila *a*, valores entre 6,7 e 94,2 (mg por 100 g) foram encontrados em microalgas, embora esses valores sejam menores do que os observados na literatura para vegetais como brócolis e espinafre (EL DIN et al., 2012). Estudos no sentido de estabilizar a molécula de clorofila na biomassa de microalgas são necessários e apontam para um mercado promissor.

A clorofila faz parte da alimentação animal, inclusive humana, com a ingestão de vegetais, sendo esse hábito considerado saudável e incorporado cada vez mais ao estilo de vida moderno. Todavia, os trabalhos científicos que relatam efeitos benéficos à saúde humana trazidos pela ingestão de vegetais foram realizados com extratos vegetais e não com a clorofila isolada (SCHWARTZ; LORENZO, 1990; RANGEL, 2000).

A partir da estrutura básica, cinco classes de clorofila existem naturalmente em organismos fotossintéticos: clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c*, clorofila *d* e clorofila *e*, predominando nas plantas superiores a clorofila *a*, clorofila *b* e seus respectivos metabólitos como: feofitina, clorofilídeos e feoforbídeos. Em algas e outros organismos fotossintéticos, além das clorofilas *a* e *b* também são encontradas as clorofilas *c*, *d* e *e* (SHEER, 1991; BECHTOLD; MUSSAK, 2009).

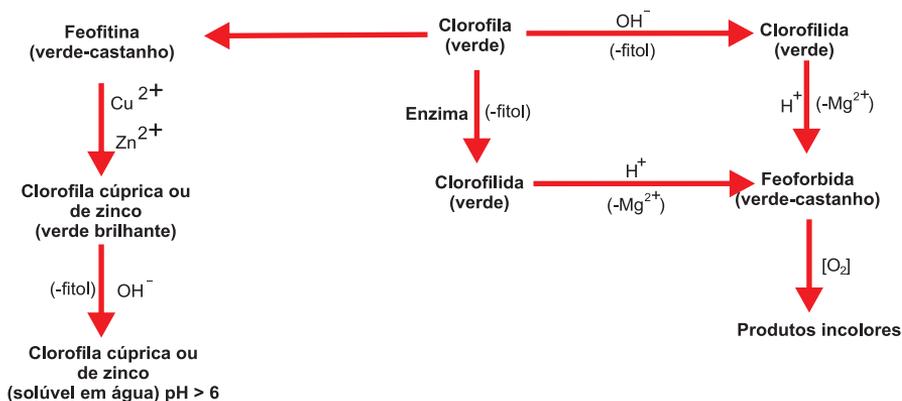
A clorofila *a*, mais abundante e importante dessa família, corresponde a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais. A clorofila *a* consiste de uma porfirina de cabeça hidrofílica formada por quatro anéis pirrólicos ligados a um átomo “quelante” de magnésio ao centro e uma cauda “fitol” hidrofóbica. A clorofila *b* possui a mesma estrutura da clorofila *a*, porém possui um grupo – CH=O presente no segundo anel pirrólico, no lugar de um grupo metila. A clorofila *c* possui apenas a cabeça hidrofílica da porfirina, sem a cauda hidrofóbica (GROSS, 1991; BARSANTI; GUALTIERI, 2006b). A clorofila *d* é um constituinte natural das algas vermelhas e se diferencia da clorofila *a* por conter o grupo formil presente no primeiro anel pirrólico no lugar de um grupo vinil (LOUGHLIN et al., 2013).

Recentemente, uma nova categoria de clorofila foi reportada e denominada clorofila *f*, sendo purificada da cianobactéria *Halomicronema hongdechloris* e sua estrutura elucidada como [2-formil]-clorofila *a* (WILLOWS et al., 2013). Os produtos formados a partir da degradação da clorofila podem, algumas

vezes, constituir uma fração significativa do total de pigmentos verdes presentes na água do mar. Essas formas degradadas, ou clorofila não funcional, absorvem a luz na região vermelha do espectro (LORENZEN, 1967).

Das formas degradadas de clorofila, a coloração dos clorofilídeos é semelhante à da clorofila original, enquanto as feofitinas e os feoforbídeos, que são produtos resultantes da remoção do átomo de magnésio e substituição por dois átomos de hidrogênio das clorofilas e dos clorofilídeos, respectivamente, apresentam coloração verde tendendo ao marrom, sendo que a remoção desse átomo é fundamental para a mudança de cor (LANFER-MARQUEZ, 2003).

A mudança na coloração de células de plantas, algas e organismos fotossintéticos de verde para amarelo é resultado da conversão da clorofila em feofitina. A clorofila *a* pode ser prontamente convertida em feofitina com a simples adição de um ácido fraco ou diluído, sendo esse procedimento utilizado na metodologia de determinação da feofitina (LORENZEN, 1967). Um fluxograma esquemático mostrando os compostos formados após a degradação da clorofila é apresentado na Figura 6.3.



Fonte: Streit e colaboradores (2005).

Figura 6.3. Fluxograma mostrando os compostos formados pela degradação da clorofila.

A atividade fotossintética de algas, responsável por mais de 50% da fotossíntese global, torna possível converter a radiação fotossinteticamente ativa em energia biologicamente utilizável, através de reações de redução e oxidação. Durante o processo da fotossíntese, o carbono é convertido do seu estado máximo de oxidação para componentes fortemente reduzidos, utilizando luz como energia. Nesse processo, a luz é especificada como um substrato e a clorofila *a* é um agente catalisador (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

As microalgas se distinguem por variações químicas e diferenças morfológicas. Dentre as variações químicas, está a presença dos diferentes tipos de clorofila, estando a clorofila *a* presente em todas as espécies, independentemente da divisão, porém as demais clorofilas estão distribuídas nos diversos grupos. As espécies pertencentes ao grupo das cianobactérias e aos filos de microalgas Glaucophyta e Rhodophyta possuem apenas clorofila *a* ou *a* e *d*, enquanto os filos Prochlorophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta e Chlorophyta possuem as clorofilas *a* e *b*, os Cryptophyta, Heterokontophyta e Haptophyta possuem as clorofilas *a* e *c*, e as da divisão Dinophyta possuem os três tipos de clorofilas *a*, *b* e *c* (STEVENSON et al., 1996; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

6.1.3 Carotenoide total

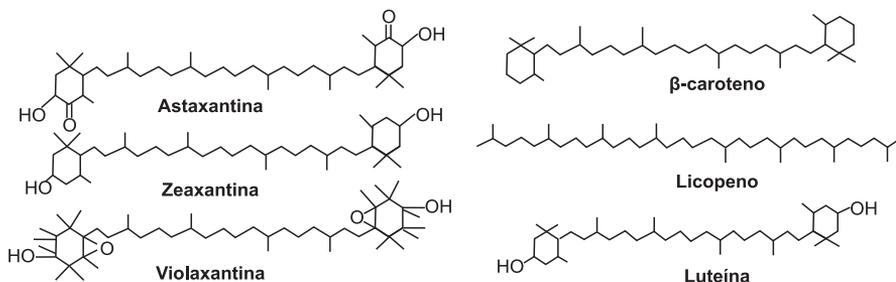
Carotenoides, assim como as clorofilas, são pigmentos orgânicos encontrados nos cloroplastos e cromoplastos das microalgas, sendo que nesses microrganismos podem ser encontrados de forma livre. A concentração média de carotenoides na biomassa da maioria das algas é de apenas 0,1-2,0% (WIJFFELS, 2007). Existem mais de 400 tipos de substâncias denominadas de carotenoides, porém, poucos são comercializados.

Os carotenoides primários podem ser sintetizados em condições normais de crescimento, enquanto os carotenoides secun-

dários são produzidos em condições desfavoráveis de nutrição do meio de cultivo, tais como: deficiência de N; mudança de pH; e, alteração da luz. Esses pigmentos são responsáveis pelas cores vermelho, amarelo e laranja, amplamente encontradas em frutas, flores, raízes, algas, invertebrados, peixes, bactérias, fungos e leveduras.

A estrutura dos carotenoides é descrita como compostos tetraterpenoides com 40 carbonos em sua estrutura e também podem ser chamados isoprenoides ($C_{40}H_{56}$), constituídos por oito unidades de C_5 -isopreno com um esqueleto central linear constituído de 22 átomos de carbono, nove duplas ligações conjugadas e extremidades finais anelares ou quase anelares com nove átomos de carbono em cada anel (LA FUENTE; OYARZÚN; QUEZADA et al., 2006; DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). As estruturas químicas de alguns carotenoides representados pelos carotenos (β -caroteno e licopeno) e xantofilas (astaxantina, zeaxantina, violaxantina e luteína) estão apresentadas na Figura 6.4.

As estruturas constituídas apenas por carbono e hidrogênio são chamadas de carotenos e seus derivados oxigenados são chamados de xantofilas. Dos carotenos acíclicos, os mais comuns são o licopeno e o zeta-caroteno e, dentre os cíclicos, o maior destaque é para o β -caroteno. Dentre as xantofilas



Fonte: Masojídek e colaboradores (2004); Spolaore e colaboradores (2006); La Fuente e colaboradores (2006).

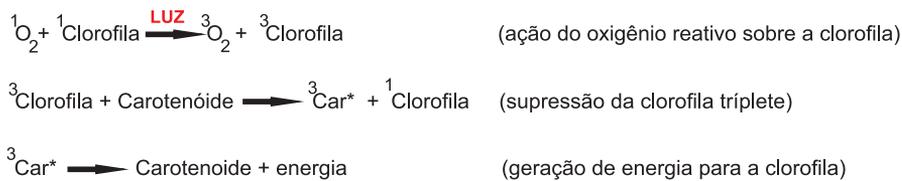
Figura 6.4. Estrutura química de alguns carotenoides representados pelos carotenos (β -caroteno e licopeno) e xantofilas (astaxantina, zeaxantina, violaxantina e luteína).

hidroxiladas, as principais são derivadas do α - e β -caroteno, como luteína, astaxantina e zeaxantina. As xantofilas epoxidadas como a violaxantina e a anteraxantina são os produtos da degradação de outros carotenoides, como a zeaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenoides são lipossolúveis e apresentam coloração variada como castanho, vermelho, laranja ou amarelo, resultante da ciclização, hidrogenação, desidrogenação, multiplicidade das duplas ligações conjugadas, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação desses processos (RODRIGUES-AMAYA, 1999). Compreendem cerca de 600 compostos estruturais produzidos a partir de bactérias, fungos, plantas superiores e algas (macro e microalgas). Nessas últimas, os carotenoides cumprem a função de absorver luz no complexo antena de cloroplastos, para a realização da fotossíntese e de proteger esses organismos contra efeitos nocivos, causados pelo excesso de radiação luminosa (MIKI, 1991).

A presença abundante de carotenoides em membranas fotossintéticas das algas sugere o desempenho de algum papel nas reações e/ou estabilização desses sistemas. Os carotenoides desempenham duas funções importantes na fotossíntese. Primeiro, atuam como antenas auxiliares, absorvendo luz em regiões do espectro visível, onde a clorofila não absorve de forma eficiente. Ainda, os mesmos transferem com eficiência a energia absorvida para outros pigmentos que, então, a direcionam ao centro de reação. O mecanismo desse processo envolve transferência de energia do carotenoide para a clorofila ou bacterioclorofila. A segunda função dos carotenoides é atuar como fotoprotetores do sistema fotossintético (Figura 6.5).

O mecanismo de fotoproteção envolve a supressão dos estados mais energéticos da clorofila (clorofila triplete), resultante da absorção do excesso de radiação luminosa, evitando a formação de oxigênio altamente reativo ($^1\text{O}_2$ -singlete) via sensibilização, o que confere ação antioxidante ao carotenoide (CARDOSO, 1997).



Fonte: Adaptado de Cardoso (1997).

Figura 6.5. Esquema da ação dos carotenoides na supressão da clorofila triplete.

A ocorrência de radicais livres é consequência da formação de oxigênio singleto, bem como de espécies reativas do oxigênio, e os carotenoides atuam suprimindo o efeito desses compostos. Segundo Fontana e colaboradores (2000), o número de duplas ligações conjugadas incluindo as duplas dos anéis terminais tipo β -ionona presentes no β -caroteno, cantaxantina e astaxantina são responsáveis pela ação antioxidante e destruidora de radicais livres. Dos carotenoides, a astaxantina é mais eficiente em sequestrar radicais peroxila, seguida, em ordem decrescente de eficiência, por zeaxantina, cantaxantina, luteína, tunaxantina e β -caroteno.

No mercado mundial, existe uma demanda de carotenoides naturais como suplementos alimentícios utilizados como corantes em margarinas, sopas, azeite e rações produzidas pelos setores como a piscicultura, a avicultura e em ensaios clínicos para tratamentos de câncer e nutrição. Na indústria alimentícia, em particular na aquicultura, utilizam-se como pigmentos naturais os carotenoides totais e astaxantina extraídos a partir da biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* para melhoria no aspecto e no aumento da aceitação e valor econômico de produtos.

Os carotenoides extraídos a partir de fontes alternativas como as microalgas, devido às suas propriedades antioxidantes, são uma das principais fontes de obtenção de vitamina A, pois é um precursor desta. Esses pigmentos, também, são de interesse na produção em escala industrial, por apresentar possível rentabilidade econômica. Nos animais, estes apresentam

várias atividades biológicas muito importantes do ponto de vista nutricional e fisiológico (MOSQUERA et al., 2005).

Os carotenoides oxigenados, como a luteína e zeaxantina, também são produzidos pela microalga *Dunaliella salina* em porcentagens consideradas altas, podendo atingir até 10% do total de carotenoides presentes nas células. Outros gêneros de microalgas de águas continentais já foram testados como fonte de carotenos na aquicultura, por exemplo, *Chlorella* (GOUVEIA et al., 1998). No Japão, três microalgas de aéreas isoladas de superfície rochosa e identificadas como *Scenedesmus* sp., *Coccolastrella* sp. e *Vischeria helvetica*, quando cultivadas em condições de estresse sob radiação luminosa de 40 a 214 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, produziram astaxantina, adonixantina, zeatina, luteína, cantaxatina e β -caroteno como principais carotenoides (ABURAI; OHKUBO; MIYASHITA et al., 2013).

Até 1980, a maioria dos carotenoides, incluindo o β -caroteno, disponível comercialmente, era sintetizada quimicamente, mas existe uma demanda crescente por esses produtos a partir de fontes naturais (SPOLAORE; JOANNIS-CASSAN; DURAN et al., 2006). Microalgas são consideradas uma fonte natural adequada desse pigmento devido ao seu crescimento rápido e fácil manipulação. Embora a produção desses pigmentos ainda apresente custo elevado, existe a vantagem de fornecer isômeros naturais, pois a qualidade é considerada superior à forma *trans* correspondente ao isômero sintético (MILLEDGE, 2011). No entanto, a produção de carotenoides a partir de microalgas se refere principalmente a astaxantina e betacaroteno de *H. pluvialis* e *Dunaliella salina*, respectivamente. Assim, há necessidade de maiores estudos em relação a diferentes espécies de microalgas e seus carotenoides para atender a essa demanda.

6.1.3.1 β -caroteno

O β -caroteno é um importante pigmento natural componente da família dos carotenoides totais, derivado de vegetais e microalgas. Este é utilizado como corante para produtos ali-

mentícios ou complemento nutricional e confere cor amarelo-alaranjada. O β -caroteno é o carotenoide com maior ação precursora da vitamina A (retinol); Ambrósio e colaboradores (2006) sugerem que o precursor deve possuir pelo menos um anel de β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica de no mínimo 11 carbonos. Além disso, o caroteno possui ação antioxidante na prevenção de doenças cardiovasculares (OSGANIAN et al., 2003).

Embora nesta publicação o enfoque seja microalgas de águas continentais, vale ressaltar que a microalga de origem marinha, *Dunaliella salina*, é principal fonte industrial de β -caroteno, produzindo de 10 a 100 vezes mais a quantidade encontrada na cenoura, que é considerada a segunda fonte desse carotenoide. A espécie *D. salina* contém β -caroteno em proporções iguais a seus isômeros *cis* e *trans*, além de possuir cerca de 6-10% de α -caroteno (HENRIQUES et al., 1998).

6.1.3.2 Astaxantina

A astaxantina (3,3'-diidroxib- β , β -caroteno-4,4'-diona), um composto de coloração rósea, opticamente ativo, derivado do β -caroteno, é considerada um carotenoide secundário (VISSER et al., 2003) e sua molécula possui dois carbonos assimétricos localizados nas posições 3 e 3' dos anéis nas extremidades da molécula (LORENZ et al., 2000).

A espécie de microalga *H. pluvialis*, unicelular, móvel e biflagelada tem sido cultivada comercialmente devido à sua capacidade de produzir e acumular astaxantina em sua forma esterificada e mais estável, em concentrações que variam de 1% a 8% da biomassa seca, sob condições de estresses ambientais como a deficiência de nitrogênio e/ou a elevada intensidade luminosa (CORDERO et al., 1996; BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Entre os organismos produtores de astaxantina, a microalga verde *H. pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozoma* são consideradas de interesse industrial (GOODWIN, 1992;

KOBAYASHI et al., 1993). Entretanto, a produção de astaxantina natural de *H. pluvialis*, *Phaffia rhodozyma* ou *Paracoccus carotinifaciens* não tem custo de produção competitivo, atendendo apenas nichos do mercado (SCHMIDT et al., 2011). As espécies de microalgas, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides* e *Scotiellopsis oocystiformis* foram sugeridas como espécies alternativas à *Haematococcus pluvialis*, para a produção de astaxantina (OROSA et al., 2001b). Embora na maioria dos trabalhos publicados, espécies do gênero *Chlorella* não tenham sido consideradas como promissoras para a produção e acúmulo de astaxantina, o uso de cultivos heterotróficos com adição de glicose, utilizando *Chlorella zofingiensis* para produção de astaxantina foi patenteado nos Estados Unidos por Chen (2006).

A otimização dos fatores de crescimento de espécies de microalgas como *H. pluvialis* visando aumentar os teores de astaxantina é importante para tornar viável a produção industrial desse pigmento. O teor de astaxantina na biomassa de *H. pluvialis* em escala comercial e em sistemas abertos denominados *raceways* foi variável nos primeiros meses até a otimização do manejo de crescimento, homogeneização e tecnologias de secagem. Nesse período, o conteúdo da astaxantina variou entre 0,7% e 3,4% da massa seca (OLAIZOLA, 2000). Após a otimização de manejo do processo de secagem da biomassa em três unidades de 25.000 L cada, os resultados indicaram leve aumento de produção da astaxantina, que variou de 2,9% a 3,0% do peso seco, por dia, no verão (OLAIZOLA, 2000).

A produção de pigmentos por microalgas é afetada por fatores químicos e físicos. Em meios de cultivo de microalgas, a alta radiação luminosa, a adição de acetato e/ou a deficiência de N funcionam como agentes estressantes e promotores do crescimento e da produção de carotenoides, aumento, conseqüentemente, os teores de astaxantina. Efeitos desses fatores são relatados para *H. pluvialis*, por Orosa e colaboradores (2001a), e para *Scenedesmus* sp., por Pirastru e colaboradores (2011).

O maior interesse comercial na produção de astaxantina está na aquicultura. Sua adição na alimentação de peixes e crustáceos confere a coloração rósea e melhora a qualidade no produto final (GOUVEIA; CHOUBERT; GOMES et al., 1998; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

A astaxantina na forma pura e cristalina aparece como um pó fino de coloração escura vermelho-acastanhado, insolúvel em água e solúvel à temperatura ambiente em solventes apolares. A astaxantina sequestra radicais livres pela supressão do oxigênio reativo e possui maior atividade antioxidante em comparação com os demais tipos carotenoides, sendo auxiliar nos tratamentos de hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, aterosclerose, alguns problemas de pele e de prevenção em determinados tipos de câncer (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

6.1.3.3 Luteína

Luteína (β , ϵ -caroteno-3,3'-diol) é um carotenoide macular, diidroxilado, de pigmentação amarela, pertencente à classe das xantofilas e um potente antioxidante. Os carotenoides de origem natural são, geralmente, de conformação isomérica em *all-trans*, que está sujeita à isomerização, transformando-se no isômero *cis*. Essa mudança de configuração pode apresentar efeito significativo nas propriedades físicas e bioquímicas dos carotenoides. Na natureza, a luteína apresenta-se como uma mistura das formas *trans* (60-90%) e *cis* (10-40%), apresentando maior estabilidade na conformação *trans*. Os isômeros *cis* da luteína apresentam coloração menos intensa quando comparados aos isômeros *trans* (MELLO, 2002).

Além de ser encontrada em algumas frutas e hortaliças de folhas verdes, a luteína está presente, também, na biomassa de microalgas, sendo que as espécies *Muriellopsis sphaerica* e *Chlorella zofingiensis* podem apresentar altos níveis durante a fase exponencial de crescimento (DEL CAMPO et al., 2000). Na Espanha, em sistema de cultivo semicontínuo de tanques abertos, no verão, células de *Muriellopsis* sp. acumularam luteína como principal carotenoide, com valores variando

de 0,4% a 0,6% da biomassa seca (BLANCO, MORENO, DEL CAMPO, RIVAS e GUERRERO, 2007).

De maneira similar à astaxantina, a luteína atua protegendo os tecidos dos danos causados por radicais livres. Segundo Dagnelie e colaboradores (2000), estes pigmentos protegem os fotorreceptores ao filtrar a luz de comprimento de onda azul (500 nm). Essa radiação é prejudicial à mácula dos olhos e, portanto, a ingestão de luteína é importante, pois atua diretamente no globo ocular e reduz em 40% a incidência da luz danosa à retina. A luteína destaca-se, também, na prevenção da aterosclerose, além da catarata, da retinopatia diabética e da retinite pigmentosa (NACHTIGALL, 2007).

6.2 Carboidratos, Proteínas e Polissacarídeos da Biomassa de Microalgas

Carboidratos e proteínas estão entre os principais componentes das microalgas, assim como os polissacarídeos funcionais e fibras na forma de celulose incrementam a digestibilidade e o valor nutricional de rações animais. Em geral, a biomassa de microalgas de diversos gêneros apresentaram valores de carboidratos totais variando de 5% a 20% e de proteína de 3,86% a 27,65% (EL DIN; EL-SHERIF, 2012). Becker (2004b) cita que os valores de carboidratos variam de 15% a 57% da matéria seca da biomassa de microalgas como *Chlorella* e *Arthrospira*. Na Tabela 6.2 são apresentados os valores médios de proteína e carboidratos de diversas espécies de microalgas.

O interesse nos estudos e utilização de fontes proteicas aumentaram já no início dos anos 1950, antecipando o crescimento populacional mundial (BECKER, 2004a). No início da década de 1960, com base em trabalhos na área de nutrição humana, foi sugerida a dose máxima de ingestão diária de 100 g de biomassa de microalgas por dia (POWELL et al., 1961). O cálculo da taxa de eficiência da qualidade de proteína como

uma medida da qualidade da proteína foi determinada em uma mistura de *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella* spp. na proporção aproximada de 10:1 (COOK et al., 1966).

Tabela 6.2. Teores de carboidratos na biomassa de espécies de microalgas.

Espécies de microalgas	Teores (%)	
	Proteína	Carboidrato
<i>Anabaena cylindrical</i>	43-56	25-30
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-45	40-57
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8,8-18	21-52
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64
<i>Spirulina platensis</i>	52	8-14
<i>Spirulina maxima</i>	28-39	13-16
<i>Synechococcus</i> sp.	46-63	15
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15

Fonte: Becker (2004b).

A qualidade proteica de um produto alimentício (microalgas-cereal-leite) contendo proporções variando de 22 g a 29 g de proteína por 100 g de microalgas foi comparada com a proteína de leite em pó sem gordura (desnatado) em um ensaio utilizando ratos como cobaias. Pães de aveia e trigo integral, bolinhos, biscoitos e pasta de amendoim contendo menores quantidades de biomassa de microalgas foram considerados palatáveis, mas apresentaram teores mais baixos de proteína (de 9,8 g a 15 g por 100 g) do que o produto da mistura microalgas-cereal-leite. Provavelmente, o cozimento causou perda da qualidade da proteína dos biscoitos contendo microalgas (COOK; LAU; BAILEY, 1966).

Becker (2004b) lista uma série de pré-requisitos para a utilização da biomassa de microalgas como alimento para humanos e animais:

1. Análise da composição química centesimal (proteína, carboidratos, gordura, fibras brutas, vitaminas, minerais, etc.) para adequar às necessidades da dieta de cada organismo;
2. Ausência de substâncias biogênicas e não biogênicas tóxicas (ficotoxinas, ácidos nucleicos, metais pesados, pesticidas, outros agentes tóxicos, resíduos de colheita e processamento);
3. Estudos da qualidade nutricional bioquímica e da proteína (razão eficiência proteica, utilização da proteína líquida, valor biológico e coeficiente de digestibilidade);
4. Valor suplementar da microalga com as fontes convencionais de alimentos;
5. Análises de qualidade sanitária (contaminação microbiana);

6. Avaliações de segurança (ensaios nutricionais de curta e longa duração com animais experimentais);
7. Estudos clínicos (teste para segurança e adequabilidade do produto para consumo humano);
8. Testes de aceitabilidade (essas avaliações são opcionais, tendo em vista que o consumidor irá decidir se o produto é aceitável ou não).

Atualmente, os suplementos alimentares ou alimentos saudáveis são usualmente vendidos na forma de tabletes, cápsulas e líquidos. As microalgas podem ser também incorporadas nas pastas, salgadinhos, doces, gomas e misturados aos refrigerantes e bebidas, tanto como suplemento nutritivo quanto como corante natural. A biomassa de microalgas tem potencial para melhorar o conteúdo nutricional dos alimentos processados e para funcionar como agente probiótico, que devem agir positivamente na saúde humana e animal.

Comparando o valor proteico das microalgas com alguns tipos de alimentos, Becker (1994) ressaltou a importância da utilização desses microrganismos e apresenta resultados de diversos autores com diferentes espécies com valores médios elevados de proteína variando de 8% a 71%.

A produção desses produtos de biomassa algal tem crescido no Brasil, com alguns exemplos de empresas no Estado do Paraná. Ainda neste Estado, produtos da biomassa de alguns tipos de microalgas, por exemplo, *Chlorella* sp. e *Arthrospira* sp., são comercializados na forma de pó seco em cápsulas ou comprimidos, como suplementos proteicos/carboidratos ou pigmentos (clorofila) (Figura 6.6).

Andrade e Costa (2008) citam que a microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) é classificada como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o que garante seu uso como alimento sem riscos à saúde.



Figura 6.6. Produtos da biomassa de microalgas comercializados no Brasil como suplemento proteico.

Na Alemanha, produtos a partir da biomassa de *Chlorella* de 10 marcas processadas (cápsulas ou tabletes) e nove não processadas foram examinados quanto à composição das espécies por métodos moleculares e quantificação do teor de clorofila ou produtos da degradação desta para feofitina (fitina *a*) (GÖRS et al., 2010). Os autores relatam a detecção de contaminantes microbianos como, por exemplo, bactérias ou cianobactérias, mostrando que a composição do produto estava fora dos limites especificados nos rótulos. A falta de padronização das normas de qualidade dos produtos derivados de microalgas faz com que os critérios de qualidade e composição sejam, na maioria, definidos pelos produtores e distribuidores (GROBBELAAR, 2003). No Brasil, embora os produtos de origem microalgal estejam no mercado, atualmente ainda não existe legislação específica para registro e controle de qualidade pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portanto, a população deve estar atenta aos produtos disponíveis em casas de alimentos funcionais e suplementos alimentares ou mesmo em farmácias.

6.3 Lipídeos da Biomassa de Microalgas

Todas as células vegetais, incluindo as de microalgas, apresentam lipídeos na sua composição (RICHMOND, 2004a). Os lipídeos representam um grupo muito diversificado de compostos que possuem importantes funções biológicas, tais como na formação de componentes estruturais das membranas celulares, servindo como fonte de energia, armazenamento e participação nas vias metabólicas (FAHY et al., 2011).

6.3.1 Lipídeos e sua classificação

Os lipídeos são componentes do segundo maior grupo de compostos orgânicos encontrados na matéria viva; com essa denominação, são considerados moléculas biológicas apolares, insolúveis em água, mas que se dissolvem facilmente em solventes orgânicos apolares como o éter, clorofórmio e outros (NELSON et al., 2011). A maioria desses compostos denominados lipídeos contém ácidos graxos e são, geralmente, divididos em duas categorias com base na polaridade da molécula: 1) lipídeos neutros, que compreendem acilgliceróis e ácidos graxos livres; e, 2) lipídeos polares, que são classificados em fosfolipídeos e glicolipídeos. Os lipídeos neutros são utilizados como reserva de energia pelas microalgas e os polares compõem a dupla camada da membrana celular (HALIM et al., 2012). Há também alguns tipos de lipídeos neutros que não contém ácidos graxos como os hidrocarbonetos, esteróis, cetonas, pigmentos (carotenos e clorofilas). Embora essas frações lipídicas sejam solúveis em solventes orgânicos (conforme a definição de lipídeo), elas não são convertidas em biodiesel (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Os lipídeos também são classificados em simples e complexos. Dentre os simples estão os óleos (líquidos a temperatura ambiente e de cadeia carbônica insaturada), gorduras (sólidos à temperatura ambiente e de cadeia carbônica saturada) e as ceras (cadeia longa), que são ésteres derivados de ácidos car-

boxílicos. Na classe lipídeos complexos, também insolúveis em água, estão incluídos os fosfolipídeos, glicolipídeos, carotenoides, tocoferóis (vitamina E), vitaminas A, D, K e esteroides, entre outros.

Os lipídeos simples, denominados gorduras ou triglicérides, contêm um álcool denominado glicerol e ácidos carboxílicos conhecidos como ácidos graxos. Os lipídeos mais comuns em células de microalgas são os triacilglicerídeos (TAG) ou triglicerídeo.

Uma molécula de gordura é formada quando uma molécula de glicerol se combina com uma a três moléculas de ácidos graxos para formar um monoglicerídeo, diglicerídeo ou triglicerídeo.

A diversidade em função dos lipídeos é refletida por uma variação enorme nas estruturas de moléculas lipídicas, sendo que estas são geralmente muito mais complexas devido ao número de diferentes transformações bioquímicas que ocorrem durante a sua biossíntese. Devido a essa alta diversidade, torna-se importante desenvolver uma classificação abrangente, nomenclatura química e sistema de representação para classificar os lipídeos que existem na natureza (FAHY; COTTER; SUD et al., 2011).

O sistema de classificação dos lipídeos no LIPIDMAPS é baseado no conceito de dois “blocos de construção” fundamental: nos grupos cetoacil e grupos isopreno. Consequentemente, os lipídeos são definidos como pequenas moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas e, baseado nesse sistema de classificação, os lipídeos foram divididos em oito categorias: acilgraxos, glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, sacarolipídeos e policetídeos, lipídeos esteróis e lipídeos. Cada categoria é, então, dividida em classes, subclasses e, em alguns casos, algumas subclasses são divididas em quatro níveis de classes (FAHY; COTTER; SUD, 2011).

O Banco de Dados de estrutura de mapas de lipídeos (*LIPID Maps Structure Database – LMSD*) é um banco de dados relacionados que engloba estruturas e anotações de lipídeos biologicamente relevantes. Em junho de 2012, o LMSD continha

mais de 37.000 estruturas lipídicas únicas, tornando-se o maior banco de dados público somente de lipídeos do mundo. Todos os lipídeos no LMSD podem ser classificados usando o Sistema de Classificação dos Lipídeos, resultando em 8 grupos de classificação (Tabela 6.3).

Os constituintes das moléculas de lipídeos (neutro ou polar) são categorizados com base em duas importantes características: o número total de átomos de carbono na cadeia e o número de duplas ligações ao longo da cadeia hidrocarbônica. Uma molécula de ácido graxo consiste de um grupo carboxílico hidrofílico ligado ao final de uma cadeia hidrocarbônica hidrofóbica. A definição para ácidos graxos livres pode ser: um ácido graxo ligado a um átomo de carbono (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Os ácidos graxos saturados não contêm dupla ligação, enquanto os insaturados apresentam, no mínimo, uma dupla ligação (NELSON; COX, 2011).

Tabela 6.3. Classificação dos lipídeos e número de moléculas.

Categoria de lipídeos	Número de moléculas
Ácil graxos	5.791
Glicerolipídeos	7.538
Glicerofosfolipídeos	8.005
Esfingolipídeos	3.939
Esterol lipídeos	2.617
Prenol lipídeos	1.200
Sacarolipídeos	1.293
Poliketídeos	6.744
Total	37.127

Fonte: Banco de Dados de Estrutura de Mapas de Lipídeos (*LIPID MAPS Structure Database – LMSD*).

Os acilgliceróis são ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol e classificados de acordo com o número de ácidos graxos: triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Os acilgliceróis são desejáveis para a produção de biodiesel em escala comercial, pois a transesterificação por catálise alcalina é projetada para processar acilgliceróis, sendo que essa análise tem eficiência limitada com outras frações como as de lipídeos polares e ácidos graxos livres. Outro motivo seria o baixo grau de insaturação dos acilgliceróis e outras frações lipídicas, que produzem ésteres metílicos de ácidos graxos com alta estabilidade de oxidação.

6.3.2 Produtividade e composição de lipídeos na biomassa de microalgas

As microalgas são componentes de um grupo muito variado de organismos e seus lipídeos refletem essa diversidade, apresentando teores de lipídeos totais que variam de acordo com a espécie, os níveis de nutrientes, o tipo de cultivo utilizado na produção da biomassa e as condições experimentais nas quais foram avaliadas (CHISTI, 2007b; KHAN et al., 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Resultados teóricos têm indicado que muitas microalgas possuem a capacidade de produzir quantidades consideráveis de lipídeos (HU et al., 2008). Contudo, os rendimentos médios de cultivos em grandes volumes podem ser bastante reduzidos, devido à falta de otimização dos fatores que influenciam seu crescimento.

Nos últimos anos, tem se intensificado as pesquisas com cultivos de microalgas visando ao aumento do conteúdo celular em lipídeos. Entretanto, os estudos relacionados à produtividade de lipídeos na biomassa de microalgas ainda são recentes e novas pesquisas na linha de transformação gênica podem

levar a novas possibilidades. Isso porque a quantidade e a composição dos lipídeos de microalgas também variam consideravelmente, dependendo da espécie analisada (RADMANN; COSTA, 2008; RODOLFI et al., 2009).

Em trabalhos de revisão sobre o potencial da produção de biodiesel, o teor médio de lipídeos na biomassa de microalgas pode variar bastante, de acordo com as condições de cultivo e das espécies, podendo chegar a 75% da massa seca. Li e colaboradores (2008) reportaram teores de lipídeos variando de 34% a 63%, enquanto valores de 15% a 75% foram relatados por Chisti (2007b). Os teores de lipídeos e a produtividade da biomassa de diferentes espécies de microalgas de águas continentais e marinhas apresentam diferenças significativas (Tabela 6.4) (RICHMOND, 2004b; CHISTI, 2007b; KHAN; RASHMI; HUS-SAIN et al., 2009; RODOLFI et al., 2009; Lv et al., 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A microalga *Botryococcus braunii*, por exemplo, apresenta teor de lipídeos com valores de até 75% da massa seca da biomassa algal, porém associado a uma baixa produtividade, tornando-se um problema no caso da produção comercial.

Espécies de microalgas dos gêneros *Chlorella*, *Cryptochlorella*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium* e *Tetraselmis* apresentam teores de lipídeo entre 20% e 50%, mas maiores quantidades podem ser alcançadas com diferentes condições de cultivo (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Para identificar espécies promissoras na produção de lipídeos é necessário considerar o teor de lipídeos e de biomassa, assim como a composição dos ácidos graxos, as condições de cultivo e a taxa de crescimento da microalga (HU; QIANG et al., 2008; RODOLFI et al., 2009).

A seleção de estirpes com maior produção de lipídeos deve considerar aquelas microalgas que possuem a maior relação entre os maiores teores de lipídeos da massa seca e a alta produtividade de biomassa. Pode-se observar na Tabela 6.4 que as estirpes com maior potencial produtor de lipídeo, ou seja, as

Tabela 6.4. Teor de lipídeos (%) da biomassa seca e produtividade de lipídeos ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) e de biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) de espécies de microalgas de águas continentais e cianobactérias.

Microalga	Lipídeos (%)	Lipídeos ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$)	Biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24,0-31,0	-	-
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	5-15	0,02
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07
<i>C. calcitrans</i>	14,6-16,4/39,8	17,6	0,04
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041
<i>C. protothecoides</i>	14,6-57,8	1214	2,00-7,70
<i>C. sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7	0,23-1,47
<i>C. vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20
<i>C. vulgaris</i> FGM M49	18,4	36,9	
<i>C. vulgaris</i> CCAP211/11b	19,2	32,6	
<i>C. sorokiana</i> IAM212	19,3	44,7	
<i>Chlorella</i> sp. GMM48	18,7	42,1	-
<i>Chlorella</i> sp.	10,0-48,0	42,1	0,02-2,5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-	2,90-3,64

Continua.

Tabela 6.4. Continuação.

Microalga	Lipídeos (%)	Lipídeos (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹ dia ⁻¹)
<i>Chlorella</i> sp.	18,0-57,0	18,7	-
<i>Chlorococcum</i> sp. <i>UMACC112</i>	19,33	53,7	0,28
<i>Cryptocodinium</i> <i>cohnii</i>	20,0-51,1	-	10,0
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27,4	47,3	0,17
<i>Euglena gracilis</i>	14,0-20,0	-	7,70
<i>Haematococcus</i> <i>pluvialis</i>	25,0	-	0,05-0,06
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0-40,0	-	0,32-1,60
<i>Isochrysis</i> sp.	7,1-33	37,8	0,08-0,17
<i>Monodus</i> <i>subterraneus</i> <i>UTEX151</i>	16,1	30,4	0,19
<i>Monallanthus</i> <i>salina</i>	20,0-22,0	-	0,08
<i>Nannochloris</i> sp.	20,0-56,0	60,9-76,5	0,17-0,51
<i>Nannochloropsis</i> <i>oculata</i>	22,7-29,7	84,0-142,0	0,37-0,48
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-1,43
<i>Neochloris</i> <i>oleoabundans</i>	29,0-65,0	90,0-134,0	-
<i>Nitzschia</i> sp.	16,0-47,0	-	-

Continua.

Tabela 6.4. Continuação.

Microalga	Lipídeos (%)	Lipídeos (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹ dia ⁻¹)
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	-	-
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4	0,16
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2	0,14
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0-57,0	44,8	0,003-1,9
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0-18,8/60,7	34,8	0,36-1,50
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0	-	0,004-0,74
<i>S. quadricauda</i>	1,9-18,4	35,1	0,19
<i>S. quadricauda</i>	18,40	35,1	-
<i>Scenedesmus</i> sp. FGMM19	19,6	40,80	-
<i>Scenedesmus</i> sp. DMO	21,1	53,9	0,26
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26
<i>Skeletonema</i> sp.	13,3-31,8	27,3	0,09
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5-51,3	17,4	0,08
<i>Spirulina platensis</i>	4,0-16,6	-	0,06-4,3
<i>Spirulina maxima</i>	4,0-9,0	-	0,21-0,25

Fonte: adaptada de Chisti (CHISTI, 2007b); Sing e Gu (2013); Rodolfi e colaboradores (2009) e Khan e colaboradores (2009).

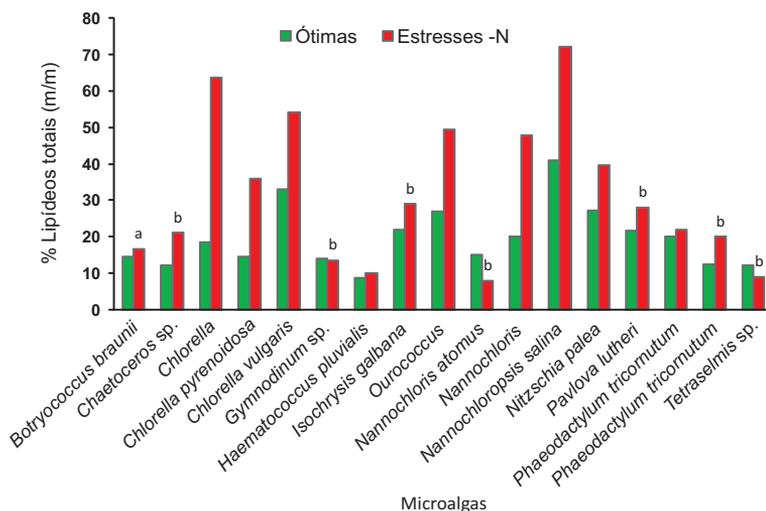
que apresentam melhor relação entre a produtividade e o teor de lipídeo foram *Chlorella protothecoides* e *Euglena gracilis*, com teores variando entre 14% e 60% da biomassa seca e produtividade entre 1.078 mg de lipídeo L⁻¹ dia⁻¹ e 1.540 mg de lipídeo L⁻¹ dia⁻¹. Considerando apenas esses dois parâmetros, as mesmas seriam as selecionadas como melhores candidatas para a produção de óleo a partir de microalgas.

No entanto, outros parâmetros devem ser considerados para a seleção de espécies mais adequadas para maiores produções de lipídeos, tais como a capacidade para se desenvolverem usando micronutrientes disponíveis ou sob condições ambientais específicas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Diversos fatores também podem influenciar o crescimento das microalgas e, conseqüentemente, afetar a produção de lipídeos:

- Fatores abióticos (pH, salinidade e substâncias químicas e tóxicas);
- Fatores bióticos (patógenos como bactérias e fungos, e competitividade com outras espécies);
- Fatores operacionais durante o cultivo (agitação, adição de bicarbonatos, profundidade, taxas de diluição e frequência da colheita).

Geralmente, o aumento da quantidade de lipídeos é resultado de crescimento em condições desfavoráveis, onde as microalgas não podem crescer de forma intensiva, armazenando esse composto em suas células (HU; SOMMERFELD; JARVIS et al., 2008; PETKOV et al., 2012). Na Figura 6.7 são apresentados os teores de lipídeos totais de diversas espécies de microalgas sob essas condições ótimas de crescimento e sob estresse por deficiência de nitrogênio; e, foi observado aumentos entre 9% e 71% quando submetidas à estresses (PETKOV; IVANOVA; ILIEV, 2012).

Sob estresse, muitas algas alteram sua via sintética lipídica, podendo levar ao aumento nos teores de lipídeos totais,



Fonte: Petkov e colaboradores (2012).

Figura 6.7. Percentagem de lipídeos em massa seca da biomassa microalga, em condições ótimas e de estresses.

principalmente na forma de triglicerídeos. Existem relatos de acúmulo de lipídeos nas células de microalgas devido à deficiência nutricional de nitrogênio e silício no meio de cultivo (DUNSTAN et al., 1993; RICHMOND, 2004b; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Entretanto, essa resposta é particular a cada espécie de microalga, sendo que em algumas delas pode ocorrer resposta negativa, ou seja, diminuição nos teores de lipídeos na biomassa quando submetidas à estresse por deficiência de nitrogênio. Diversos estudos relatam que, dependendo das espécies de microalgas, a produção de diferentes tipos lipídicos e proporção variada na composição de ácidos graxos podem ser influenciadas por fatores nutricionais e ambientais, condições e fases de crescimento (HU; SOMMERFELD; JARVIS et al., 2008; RODOLFI; CHINI ZITTELLI; BASSI et al., 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; PETKOV; IVANOVA; ILIEV et al., 2012). Outros fatores, tais como a composição do meio, temperatura, intensidade da luminosidade, fotoperíodo (ciclo

de claro/escuro) e taxa de aeração também afetam a resposta das espécies de microalgas à produção de lipídeos (RAO et al., 2007; GUZMÁN et al., 2010).

Outro fator que pode alterar a quantidade de lipídeos na biomassa algal é a fase da curva de crescimento, quando é realizada a colheita. Estudos de comparação dos lipídeos extraídos na fase logarítmica e estacionária de crescimento de microalgas mostram que na fase estacionária a fração lipídica contém abundância de lipídeo polar (51-57% m/v) e na fase logarítmica contém altos níveis de triacilgliceróis (20-40% m/v) o que torna esse período mais atrativo para a colheita da biomassa para a produção do biodiesel (DUNSTAN; VOLKMAN; BARRETTI et al., 1993; KHAN; RASHMI; HUSSAIN et al., 2009).

No geral, as microalgas contêm predominantemente ácidos graxos com cadeias saturadas e monoinsaturadas, tais como os triglicerídeos, que são os lipídeos de armazenamento mais comuns, constituintes de 80% da fração de lipídeos totais (RICHMOND, A., 2004b). Algumas cianobactérias, especialmente as espécies filamentosas, apresentam tendência de conterem na sua biomassa maiores quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (de 25% a 60% do total). De forma simplificada, diversos autores relataram que na biomassa de microalgas os lipídeos são compostos basicamente por glicerol, bases esterificadas (açúcares) e ácidos graxos com 12 a 22 carbonos, podendo ser insaturados (mono ou poli) ou saturados. Estes últimos correspondem a maior fração lipídica e os ácidos graxos poli-insaturados representam de 25% a 60% dos lipídeos totais (BECKER, 1988; MEDINA et al., 1998; BROWN et al., 1999). O número de duplas ligações nos ácidos graxos não ultrapassa seis e quase todos os ácidos graxos insaturados são isômeros *cis-trans* (HALIM et al., 2011; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Geralmente, a maioria dos ácidos graxos sintetizados, de maneira similar às plantas superiores, possui cadeia hidrocarbônica variando de C16 a C18 (SPOLAORE; JOANNIS-CASSAN;

DURAN et al., 2006; HU; SOMMERFELD; JARVIS et al., 2008). Ao contrário das plantas superiores, encontra-se em espécies de microalgas uma grande variação na composição de ácidos graxos. Algumas microalgas e cianobactérias possuem a capacidade de sintetizar ácidos graxos de cadeia média (C10, C12 e C14), enquanto outras produzem cadeias longas de ácidos graxos (> C20) (HU; SOMMERFELD; JARVIS et al., 2008).

Os lipídeos de microalgas são constituídos principalmente por ácidos graxos insaturados (52-65%) tais como ácido palmítico (16:1), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), linolênico (18:3) e ácidos graxos saturados (18-42%) com significativa maior porcentagem de ácido palmítico (16:0) e menor conteúdo de ácido esteárico (18:0) (GOUVEIA et al., 2009; KHAN; RASHMI; HUSSAIN et al., 2009; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Não somente a quantidade total, mas também o perfil de ácidos graxos desejado pode ser obtido por seleção de espécies de microalgas e por variações de condições ambientais de crescimento. Por exemplo, o cultivo de *Nannochloropsis oculata* em dois experimentos independentes mostrou respostas diferentes, de acordo com as condições ótimas de crescimento. Nessas condições, apresentou na biomassa porcentagem de 12,63% de ácido linolênico (C18:3), 40,15% de ácidos saturados, 13,31% de ácidos monoinsaturados e 44,54% de ácidos poli-insaturados. No segundo experimento, *N. oculata* cultivada em meio com alta salinidade, por um período de 4 dias, apresentou alteração no perfil de ácidos graxos e a diminuição da porcentagem de ácido C18:3 para 3,21%, ácidos saturados para 34,15% e ácidos poli-insaturados para 26,68%, além de aumentos de ácidos monoinsaturados para 36,83% (SU et al., 2011).

Na Tabela 6.5 é apresentada a composição química do perfil de ácidos graxos presentes na biomassa de algumas espécies de microalgas.

Os lipídeos de origem microalgal podem ser empregados como matéria-prima para a produção de biocombustíveis e os

Tabela 6.5. Composição química (%) dos principais ácidos graxos presentes em extratos de lipídeos de *Spirulina maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis* sp. e *Neochloris oleoabundans*.

Ácidos graxos	<i>S. maxima</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>N. oleoabundans</i>
	(%)			
C14:0	0,34	3,07	1,48	0,43
C16:0	40,16	25,07	21,78	19,35
C16:1	9,19	5,25	5,95	1,85
C16:2	n.d.	n. d.	3,96	1,74
C16:3	0,42	1,27	0,68	0,96
C16:4	0,16	4,06	0,43	7,24
C18:0	1,18	0,63	0,45	0,98
C18:1	5,43	12,64	17,93	20,29
C18:2	17,89	7,19	21,74	12,99
C18:3	18,32	19,05	3,76	17,43
C18:4	0,08	n. d.	0,21	2,10
C20:0	0,06	0,09	n. d.	n. d.
C20:1	n. d.	0,93	n. d.	n. d.
C20:2	0,48	n.d.	n. d.	n. d.
C20:3	n. d.	0,83	n. d.	n. d.
C20:4	n. d.	0,23	n. d.	n. d.
C20:5	n. d.	0,46	n. d.	n. d.
Saturada (%)	41,74	28,56	23,71	20,76
Insaturada (%)	51,97	51,91	54,66	64,60

Fonte: Modificada de Gouveia e Oliveira (2009).

n. d.: não determinada.

ácidos graxos poli-insaturados e possuem mercado biotecnológico promissor para produtos farmacológicos, cosméticos, alimentação humana e animal com elevado valor nutritivo. Algumas das aplicações dos ácidos graxos de microalgas são: o enriquecimento de rações para peixes e a alimentação de galinhas para produção de ovos com ômega-3 (PULZ et al., 2004), utilização nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, para elaboração de cremes e fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana (MORAIS; COSTA, 2008); por exemplo, o ácido docosaenoico (*DHA*), essencial da família ômega-3, é utilizado para enriquecimento de leite para lactantes, suplemento nutricional e fórmulas infantis (SPOLAORE; JOANNIS-CASSAN; DURAN et al., 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados ainda têm função na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, aterosclerose, arritmia, redução da pressão arterial, redução dos níveis de colesterol e triglicérides no plasma, artrite reumatoide e câncer, sendo, aparentemente, essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral (DERNER; OHSE; VILLELA et al., 2006).

A microalga *Chlorella* é considerada uma opção para prevenir o câncer por conta de sua capacidade de limpar o corpo de toxinas e metais pesados. Esta microalga tem sido descrita como o alimento perfeito, que regula o açúcar no sangue, mata as células com câncer, fortalece o sistema imunológico e até mesmo inverte o ciclo de envelhecimento. Todavia, Milledge (2011) cita a Sociedade Americana do Câncer (*American Cancer Society*), a qual declara que os dados científicos disponíveis não permitem essas declarações. Os estudos científicos ainda não suportam a efetividade de microalgas para prevenir ou tratar o câncer ou qualquer outra doença em humanos. Devido a isso, nos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration* (FDA) alertou os proprietários de pelo menos um site para não continuarem a fazer afirmações não comprovadas sobre os benefícios do consumo da *Chlorella* (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Além dos empregos terapêuticos, os lipídeos da biomassa de microalgas podem ser inseridos na cadeia produtiva da produção de biocombustíveis. Atualmente, o homem explora em grandes proporções as fontes convencionais de energia, como os combustíveis fósseis e fontes não renováveis, as quais podem ser esgotadas (VERTES et al., 2006).

No caso das microalgas, muitas especulações têm surgido quanto às suas potencialidades na produção de biodiesel. Existem composições químicas descritas para algumas delas que indicam a presença de até 55,3% de ácido linolênico (C18:3), como é o caso da *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). Quando cultivadas na presença de dióxido de carbono, espécies como *Chlorella kesslen*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* produzem elevados teores de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados (MORAIS; COSTA, 2008). Esses óleos têm elevada tendência à oxidação, não sendo apropriados à produção de biodiesel, pois perdem as insaturações e promovem reações de polimerização e aumento de viscosidade e solidificação em baixas temperaturas.

6.3.3 Extração de lipídeos da biomassa de microalgas

Dependendo do pré tratamento aplicado na concentração de células da biomassa de microalgas, esta pode ser submetida à extração de lipídeo na forma concentrada úmida ou em pó seco. Durante o processo de extração, a biomassa é submetida à eluição com solventes orgânicos, os quais extraem os lipídeos da matriz celular. Trabalhos de revisão sobre a recuperação e purificação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) derivados de microalgas apresentam e discutem técnicas de concentração e purificação utilizando o fracionamento com ureia e cromatografia líquida (MEDINA; GRIMA; GIMÉNEZ et al., 1998). Na Tabela 6.6 são apresentados alguns métodos de extração de lipídeos.

Tabela 6.6. Vantagens e limitações dos métodos para extração de óleo da biomassa de microalgas.

Método de extração	Vantagens	Limitações
Prensa de óleo	Fácil uso, sem uso de solvente	Exige grande quantidade de amostras
Extração com solventes	Solvente relativamente barato, reproduzível	Solventes orgânicos inflamáveis e/ou tóxicos, recuperação solvente cara e gasto de energia; uso de grandes quantidades de solventes
Extração com fluido supercrítico	Não tóxico (ausência de solvente orgânico não inflamável) e operações simples	Geralmente falha na extração do composto polar, insuficiente interação entre CO ₂ supercrítico e amostra
Ultrassom	Reduzido tempo de extração e de consumo de solvente, grande penetração do solvente dentro do material celular e melhora da liberação do conteúdo celular	Alto consumo de energia, dificuldade em aumentar a escala do processo

Fonte: Harun e colaboradores (2010) e Singh e colaboradores (2010).

O princípio de extração de lipídeos de microalgas por solventes apolares orgânicos está embasado no conceito da química básica de polaridade: “semelhante dissolve semelhante”. Quando uma microalga é exposta a um solvente orgânico neutro, como hexano ou clorofórmio, o solvente penetra através da membrana celular no citoplasma e interage com os lipídeos neutros através de forças de van der Waals para formar um

complexo solvente-lipídeo. Esse complexo orgânico solvente-lipídeo é conduzido por gradiente de concentração disperso através da membrana celular e um filme orgânico que envolve a célula. Consequentemente, os lipídeos neutros são extraídos para fora da célula, permanecendo dissolvidos em solvente orgânico apolar. Esse filme é formado devido à interação entre o solvente orgânico e a parede celular.

Dentre os métodos clássicos de extração e determinação de lipídeos e que podem ser utilizados para a biomassa de microalgas, destacam-se o Bligh-Dyer (1959) e Folch (1956), os quais apresentaram com o passar dos anos inúmeras modificações. Pela simplicidade e rapidez, a metodologia que utiliza a fluorescência com vermelho do Nilo tem sido amplamente utilizada para selecionar estirpes de microalgas bem como para avaliar efeitos de tratamentos na concentração de lipídeos (COOKSEY et al., 1987; LEE et al., 1998; SPIEKERMANN et al., 1999; WEI et al., 2009; BERTOZZINI et al., 2011; CHEN et al., 2011; GARDNER et al., 2011). Ainda devem ser enfatizados os métodos de quantificação de lipídeos de cromatografia gasosa (ELTGROTH et al., 2005) pela qualificação do perfil de ácidos graxos presentes na biomassa de diversas espécies de microalgas (GRIFFITHS et al.; HERRERA-VALENCIA et al., 2011; TALEBI et al., 2013).

As tecnologias de extração de lipídeo para a produção de biodiesel de microalgas devem exibir elevado nível de especificidade, a fim de minimizar a extração também de contaminantes como pigmentos, proteínas e carboidratos. O método utilizado também deve ser mais seletivo para acilgliceróis do que para outras frações lipídicas que não serão convertidas em biodiesel (MEDINA; GRIMA; GIMÉNEZ et al., 2012).

6.4 Microalgas como Fonte de Energia Renovável Alternativa

Devido a problemas relacionados ao aquecimento global e ao consumo de combustíveis fósseis, tem-se buscado alternati-

vas para a produção de energia. Nesse novo cenário energético, a produção e desenvolvimento das chamadas energias renováveis têm recebido maior atenção mundial. O estudo dos metabólitos produzidos por microalgas tem permitido avanço nas pesquisas relacionadas a novas fontes de energia renovável. Esses microrganismos têm sido estudados e utilizados como fonte de biocombustíveis, tais como biodiesel e bioetanol. Um grande número de espécies de microalgas tem mostrado a habilidade de produzir gás hidrogênio a partir de energia solar e gás metano a partir da fermentação da sua biomassa, sendo também explorado pelo homem para geração de energia.

Um esquema ilustrativo das possíveis rotas da produção de energia via biomassa de microalgas é apresentado na Figura 6.8.

Já faz alguns anos que o biodiesel vem ganhando interesse na indústria, refletindo numa maior atenção para a produção



Fonte: Adaptada de Tsukahara e colaboradores (2005) e Wang e colaboradores (2008).

Figura 6.8. Esquema das possíveis rotas da transformação bioquímica da biomassa de microalgas para produção de bioenergia.

de microalgas. Soma-se o fato de que o cultivo de microalgas não só oferece grandes oportunidades para o desenvolvimento sustentável na produção de biocombustíveis, mas também é muito importante para uma série de outras *commodities* lucrativas (HU; SOMMERFELD; JARVIS et al., 2008).

6.4.1 Produção de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄) a partir da biomassa de microalgas

A produção de hidrogênio a partir de microalgas é realizada pelo uso de sistemas fotobiológicos em fotobiorreatores, os mesmos utilizados para a obtenção de biomassa, com condições de cultivo (concentração de CO₂ e O₂ dissolvido, pH, nitrogênio, temperatura, luz e agitação) controladas para favorecer a produção de hidrogênio pelas células. No que diz respeito às microalgas verdes e cianobactérias, o hidrogênio pode ser formado por biofotólise direta ou indireta (BENEMANN, 2000; CARIOCA, 2010). Em uma revisão sobre o uso de microalgas como fonte de biocombustível, Demirbas (2010) mostra o potencial da produção de hidrogênio por pirólise da biomassa de algumas espécies de microalgas.

A habilidade das microalgas em produzir hidrogênio a partir da energia solar tem sido explorada e diferentes métodos foram desenvolvidos e avaliados (SKJÅNES et al., 2013). Um modo prático é avaliar a presença da enzima hidrogenase e a capacidade de produção de H₂; depois, se as microalgas selecionadas têm crescimento rápido em condições ambientais; se possuem mecanismo de adaptação para deficiência de nutrientes entre outros fatores ambientais estressantes; e, por fim, se possuem alta capacidade de produzir metabólitos de interesse para a indústria farmacêutica, antes e após a produção do H₂.

No início da década de 1940, Gaffron e colaboradores (1942) observaram que o metabolismo do H₂ pela alga verde *Scenedesmus* sp. em condições anaeróbicas permitia utilizá-lo como doador de elétrons no processo de fixação do CO₂ ou evoluir o H₂ em ambas as condições, no escuro e na luz. O pré-

-requisito para a produção biológica de hidrogênio (H_2) por microalgas é a criação de um ambiente anaeróbico, ou seja, a retirada do oxigênio das condições de cultivo, o que pode ser feito por métodos químicos ou físicos (SKJÅNES; REBOURS; LINDBLAD, 2013), porque as enzimas hidrogenase ou nitrogenase, catalisadoras desse processo biológico, podem funcionar apenas em condições anaeróbicas (GHIRARDI et al., 2000).

A capacidade de produção de hidrogênio em diferentes quantidades foi desenvolvida no processo de adaptação de culturas de microalgas a condições de estresses, tais como radiação e adição de substrato. As perspectivas para o uso de microalgas como transformadoras de energia solar em hidrogênio molecular foram apresentadas por Zolotareva e colaboradores (2010). Um trabalho conduzido com a estirpe de *Chlorella vulgaris* (MSU 01), isolada de sedimentos de lagoas, mostrou a produção de hidrogênio molecular. Para otimizar o meio para microalgas, farelo de milho em concentrações variando de 1 g L^{-1} a 5 g L^{-1} foi testado no crescimento e produção de hidrogênio e a concentração celular no 10º dia foi de $1,6\text{-}19\text{ g L}^{-1}$ em massa seca. A fermentação anaeróbica dessa estirpe de *C. vulgaris* envolvendo complexos processos com fontes de carbono tais como manitol, glicose, alanina, ácido cítrico, ácido aspártico, L-alanina, L-cisteína, succinato de sódio e piruvato de sódio aumentou a taxa de evolução de H_2 e a concentração de butirato (AMUTHA et al., 2011).

Lakaniem e colaboradores (2011) reportaram que as microalgas são matéria-prima promissora para a produção de energia renovável, devido às suas altas eficiências fotossintéticas, altas taxas de crescimento e ser desnecessária a alimentação externa de carbono orgânico. Nesse estudo, os autores utilizaram biomassa de *Chlorella vulgaris* (água doce) e *Dunaliella tertiolecta* (microalga marinha) como uma matéria-prima para produção anaeróbica de H_2 e CH_4 . Os resultados desses ensaios anaeróbicos em frascos de soro foram conduzidos a 37°C , com culturas de enriquecimento de lamas derivadas de digestor anaeróbico municipal. Sem inoculação, a biomassa algal ainda produziu H_2 devido às atividades de bactérias saté-

lite associadas a culturas de algas e CH_4 foi produzido a partir de ambos os tipos de biomassa, com enriquecimentos anaeróbios. A produção de H_2 por bactérias satélite foi comparável a de *D. tertiolecta*.

A tecnologia de fermentação para a obtenção de metano por microalgas tem recebido considerável atenção devido à produção de compostos de valor agregado no mercado, por exemplo, o biogás, que consiste principalmente de uma mistura de metano (55-75%) e CO_2 (25-45%) produzidos por microrganismos durante a digestão anaeróbica (CARDOSO, 1997). O metano da digestão anaeróbica pode ser utilizado como gás combustível e também ser convertido para a geração de eletricidade. Já o CO_2 oriundo da digestão anaeróbia e da queima do metano, assim como o proveniente de indústrias, pode ser utilizado para o cultivo das microalgas, injetando-o no sistema fechado de cultivo (MORAIS; COSTA, 2008). Os pesquisadores De Schampelaire e Verstraete (2009) apresentaram um modelo de sistema fechado para conversão de energia solar no qual a biomassa algal é utilizada para alimentar a unidade de digestão anaeróbica para produção de biogás. Assim, também, outro modelo fechado (SunCHem®) foi descrito por Haiduc e colaboradores (2009), que testaram uma estirpe de microalga da espécie *Phaeodactylum tricornutum* com capacidade de produzir metano com alta eficiência de gaseificação do carbono (68-72%) da biomassa.

6.4.2 Produção de bioetanol por fermentação da biomassa de microalgas

A utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de energias alternativas, incluindo o bioetanol, tem apresentado sustentabilidade e estudos apontam que em futuro próximo as microalgas serão utilizadas em escala comercial para tal finalidade (SIVAKUMAR et al., 2010). Em geral, na produção de bioetanol de biomassa são adotados dois métodos: o bioquímico ou fermentação e o termoquímico ou gaseificação (SINGH; GU, 2010).

6.4.3 Lipídeos de microalgas como potencial fonte de biodiesel

Biodiesel é o nome dado a compostos monoalquilésteres de ácidos graxos, provenientes da alcoólise de óleos vegetais e/ou gorduras animais e microrganismos ou pela esterificação de ácidos graxos. Tradicionalmente, o biodiesel é produzido através das reações de transesterificação de triglicerídeos. Nesse processo são empregados alcoóis monohidroxilados de cadeia curta na presença de catalisadores alcalinos homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos (CANAKCI, 2007; KUCEK et al., 2007) e, posteriormente, é preciso proceder com etapas de purificação (BERRIOS et al., 2008).

Esses ésteres derivados de fontes biológicas são uma alternativa energética limpa e renovável. Emitem menos poluentes que o diesel para o ambiente e não comprometem o funcionamento dos motores diesel (caminhões, tratores, camionetes, automóveis, etc.) e/ou estacionários (geradores de energia, calor e outros), com desempenho muito próximo do diesel, sem a exigência de modificações nos motores (RYAN, 2004; HANNA et al., 2005).

No Brasil, a indústria nacional de biocombustíveis ainda é baseada essencialmente na produção de etanol através da fermentação microbiana de açúcares ou amidos e na produção de biodiesel derivado de óleos vegetais. Um dos grandes destaques na área de biocombustíveis é o interesse pelo uso de recursos naturais e resíduos agroindustriais baseados em materiais lignocelulósicos para a produção de etanol e bio-óleo, ou fontes produtoras de lipídeos utilizados para a produção de biodiesel (GUEDES et al., 2010). Nesse contexto de utilização de recursos naturais, pode-se incluir como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, também, os microrganismos fotossintetizantes, como as microalgas.

Hoje, no Brasil, o biodiesel (B100%) atende à especificação da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) descrita na Resolução ANP nº. 07/2008, enquanto nos Estados Unidos, vigora a norma ASTM D6751, da *American*

Society for Testing and Materials (ASTM) e, na Europa, a norma EN 14214, do *European Committee for Standardization* (CEN).

Embora sejam significativos, outros avanços tecnológicos ainda devem ser alcançados para transformar o biodiesel em um produto realmente sustentável e economicamente competitivo. A viabilidade econômica do mesmo pode ser freada mais pelos altos preços das matérias-primas oleaginosas do que por limitações tecnológicas ou de processamento (HASS et al., 2006).

A relação entre a estrutura química e os teores de cada uma das substâncias presentes na matéria-prima é de fundamental importância, pois estas refletirão não só nas propriedades físico-químicas do biocombustível, mas poderão afetar a queima no motor, a formação de depósitos no sistema de injeção e ainda o tipo e a quantidade de substâncias ou gases poluentes emitidos (HASS; ALOON; YEE et al., 2006).

Para a produção de biodiesel, é preferível a predominância de ácidos graxos saturados, que possuem alto número de cetano e são menos propensos à oxidação que os compostos insaturados (CANAKCI, 2007). Pela especificação ASTM PS 121-99, o biodiesel deve ser composto por ésteres de cadeias hidrocarbônicas entre C:12 e C:22. O biodiesel produzido a partir dos óleos de soja, canola, dendê, girassol e outros contendo cadeias hidrocarbônicas de C:16 a C:18 têm pontos de ebulição na faixa de 330-357°C, atendendo às especificações da ANP.

Além disso, ésteres de ácidos graxos com longas cadeias carbônicas (a partir de C:20), como também cadeias saturadas C:16 (ácido palmítico) e C:18 (ácido esteárico) possuem maior tendência a se solidificarem em baixas temperaturas do que as mesmas cadeias carbônicas insaturadas de até 18 carbonos (C:18 - ácido linoleico), podendo, portanto, tornar o biodiesel impróprio para o uso em climas frios (DABDOUB et al., 2009).

As cadeias saturadas, em contrapartida, têm a vantagem de apresentar maior estabilidade à auto-oxidação, fazendo com que parâmetros de estabilidade à oxidação para o biodiesel sejam atendidos mais facilmente do que no caso da presença majoritária de cadeias insaturadas ou poli-insaturadas.

A presença de cadeias insaturadas reduz a possibilidade de gelificação ou solidificação do biodiesel, sendo um incon-

veniente menor em climas frios. Por outro lado, a presença na biomassa de microalgas de teores elevados de ácido linolênico (C:18:3) ou ácidos graxos com quatro ou mais insaturações na cadeia hidrocarbônica do óleo resultará em tendência muito elevada à oxidação do biodiesel. Em função disso, os teores de ácido linolênico são limitados a no máximo 12% e poli-insaturados com mais de quatro duplas ligações a no máximo 1%, fato que limita o uso de certas matérias-primas para a produção de biodiesel com a qualidade exigida (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

A simples análise da composição química dos óleos é suficiente para se inferir sobre possibilidades, potenciais e adequação do uso de uma determinada matéria-prima quanto à produção de biodiesel de alta qualidade. Nesse sentido, conhecer a composição química detalhada do óleo ou gordura, seja qual for a sua origem, é muito mais importante do que simplesmente realizar a transesterificação em escala de laboratório. Isso porque a qualidade, em termos de características físicas e químicas do biodiesel obtido, é função direta da composição química do óleo ou gordura utilizada como material de partida. Portanto, é necessário conhecer o perfil de ácidos graxos, assim como a presença de outras substâncias na composição química de uma determinada matéria-prima para entender, a priori, as características do biodiesel que pode ser obtido (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009) e como escolher as mais adequadas, uma vez que a composição química do óleo seria suficiente para mostrar se o biodiesel derivado atenderá, ou não, às especificações de qualidade da Resolução nº 07 de 2008 (RANP 07/08).

O interesse na produção de biocombustíveis a partir do cultivo e processamento de microalgas têm se destacado recentemente devido ao alto teor de lipídeo de algumas espécies e também pelo fato de que a síntese desse lipídeo, especialmente triacilgliceróis, pode ser modulada variando as condições de cultivo (RODOLFI; ZITTELLI; BASSI et al., 2009). Outro fator a favor do uso dessa matéria-prima é o fato de que esses microrganismos possuem crescimento rápido e não ocupam grandes

áreas para produção quando comparados aos vegetais (CHISTI, 2007a; GRESSEL, 2008) e, quando de metabolismo autotrófico, consomem dióxido de carbono.

Lipídeos sintetizados em células de microalgas, os chamados triacilgliceróis (TAGs), são os mais valiosos como potencial fonte de biocombustível porque podem ser submetidos ao processo de transesterificação para produção de biodiesel (HSIEH et al., 2012). O biodiesel pode ser obtido da transesterificação de triglicerídeos com metanol porque é o álcool mais barato e disponível. Entretanto, para acelerar a reação é preciso adicionar catalisadores (VAN GERPEN; SHANKS; PRUSZKO et al., 2004).

6.5 Aplicações Biotecnológicas das Microalgas na Agropecuária e na Biorremediação

As microalgas são encontradas principalmente em ambientes aquáticos, mas também podem ser encontradas na camada superficial do solo. Embora sejam, em sua maioria, de vida livre, algumas estabelecem relações com uma variedade de outros organismos (RICHMOND, 2004a). O número exato de espécies microalgais ainda é desconhecido, podendo variar entre 200.000 até alguns milhões de representantes. Tal diversidade reflete na composição bioquímica e, dessa forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (PULZ, 2001; PULZ; GROSS, 2004; RICHMOND, 2004b).

Por apresentarem promissoras propriedades, microalgas foram sugeridas como excelente fonte natural de compostos antioxidantes com alto potencial protetor do DNA (KARAWITA et al., 2007). A produção de citocinina e clorofilas foi avaliada em microalgas (STIRK et al., 2002). Também, compostos com atividade antioxidante foram isolados da biomassa de microalgas e verificado que a maior parte apresenta fenólicos na sua composição (HAJIMAHMOODI et al., 2009; 2010).

Em cultivos axênicos de duas espécies de microalgas, *Scenedesmus armatus* e *Chlorella pyrenoidosa*, foi observada a

presença de compostos indutores de crescimento ou com outras funções, tais como ácido indol acético (MAZUR et al., 2001). Do ponto de vista ambiental, o papel das microalgas tem recebido cada vez mais destaque, por possuírem uma variada gama de aplicações na agricultura, pecuária e na indústria farmacêutica (ÖRDÖG et al., 2004).

A capacidade de realizar a fotossíntese permite às microalgas a incorporação de isótopos estáveis (^{13}C , ^{15}N , ^2H) provenientes de moléculas inorgânicas relativamente baratas ($^{13}\text{CO}_2$, $^{15}\text{NO}_3$ e $^2\text{H}_2\text{O}$) para compostos orgânicos com alto valor de mercado como, por exemplo, aminoácidos, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Esses isótopos estáveis bioquimicamente são utilizados principalmente para dois propósitos: incorporação em proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, para facilitar a sua determinação a nível atômico e em estudos metabólicos, explorando o aumento de massa de compostos marcados (SPOLAORE; JOANNIS-CASSAN; DURAN et al., 2006).

6.5.1 Fixação biológica de CO_2 e biorremediação

Medidas de biomitigação e biorremediação estão na pauta das ações a serem tomadas pelas autoridades. As microalgas são as principais responsáveis pela absorção biológica do CO_2 atmosférico nos oceanos, que cobrem 3/4 da superfície do globo terrestre, uma vez que estão presentes em grande número na coluna de água (FALKOWSKI et al., 1997).

A fixação de CO_2 utilizando espécies de microalgas de crescimento rápido fornece uma alternativa promissora para a mitigação desse gás de efeito estufa. O que torna o cultivo de microalgas uma estratégia sustentável é a combinação da mitigação com a produção de bioenergia ao utilizar a biomassa para extrair óleo e produzir metano e bioetanol (DE MORAIS et al., 2007; HAIUC; BRANDENBERGER; SUQUET et al., 2009; MIKE, 2009; MCGINN et al., 2011; SINGH et al., 2012; HO et al., 2013).

Em um estudo conduzido com duas espécies de microalgas, *Scenedesmus obliquus* (SJTU-3) e *Chlorella pyrenoidosa* (SJTU-2), foi sugerido que essas microalgas são apropriadas para uso nos processos de mitigação de gás carbônico na atmosfera, por crescerem em meios com concentrações de até 50% de CO₂ (TANG et al., 2011), além da produção de bioenergia da biomassa. Esse fato é importante porque, segundo dados da literatura, os cultivos de microalgas realizados com maiores concentrações de CO₂ (12% e 18%) apresentaram maior produção de ácidos graxos insaturados (RADMANN; COSTA, 2008; TANG; HAN; LI et al., 2011), podendo contribuir para a biomitigação do dióxido de carbono. As microalgas são reconhecidas por apresentarem eficiência fotossintética de 10 a 50 vezes superior às plantas C₄, que apresentam em torno de 3-6% de captura de CO₂ da emissão por combustíveis fósseis. Esses microrganismos fotossintetizantes ainda apresentam alta contribuição devido às taxas de proliferação rápida, grande variedade de tolerância a ambientes extremos, além de apresentarem excelente adaptabilidade a cultivos intensivos, o que as torna eficazes na redução do CO₂ atmosférico (SATO et al., 2001).

Todd e colaboradores (2002) investigaram a biotransformação de compostos xenobióticos tóxicos, tais como o naftaleno (hidrocarboneto policíclico) e éteres diarílicos, por culturas axênicas de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. (S11) e *Ankistrodesmus* sp. (S12), mostrando que os mesmos foram transformados para metabólitos mais polares. A importância da biorremediação com microalgas continua sendo destaque nas pesquisas de biomitigação do CO₂ e alguns exemplos de espécies de microalgas utilizadas são apresentados na Tabela 6.7.

A toxicidade e natureza essencial de selênio (Se) no ambiente depende da sua concentração e das formas químicas em que se encontra. O elemento Se e seus derivados podem ser amplamente dispersos por todo o meio ambiente como resultado de entradas antropogênicas como, por exemplo, a queima de combustíveis fósseis e processos industriais, agrícolas e naturais (OLIVAS et al., 1994). Águas residuais da agricultura

Tabela 6.7. Espécies de microalgas estudadas para biomitigação do dióxido de carbono (CO₂).

Espécie de microalga	CO ₂ (%)	Temperatura (°C)	P (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	PCO ₂ (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	Referência
<i>Chlorococcum littorale</i>	40	30	N/A	1,0	Iwasaki et al. (1998)
<i>Chlorella kessleri</i>	18	30	0,087	0,163	De Morais e Costa (2007)
<i>Chlorella</i> sp. UK001A	15	35	N/A	> 1	Murakami et al. (1997)
<i>C. vulgaris</i>	15	N/A	N/A	0,624	Yun et al. (1997)
<i>C. vulgaris</i>	Ar	25	0,040	0,075	Scragg et al. (2002)
<i>C. vulgaris</i>	Ar	25	0,024	0,045	Scragg e Bonnett (2002)
<i>Chlorella</i> sp.	40	42	N/A	1,0	Sakai et al. (1995)
<i>Haematococcus Pluvialis</i>	16-34	20	0,076	0,143	Huntley e Redalje (2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ar	-	0,009	0,016	Gomez-Villa et al. (2005)

Continua.

Tabela 6.7. Continuação.

Espécie de microalga	CO ₂ (%)	Temperatura (°C)	P g L ⁻¹ dia ⁻¹	PCO ₂ g L ⁻¹ dia ⁻¹	Referência
<i>S. obliquus</i>	Ar	-	0,016	0,031	Gomez-Villa et al. (2005)
<i>Botryococcus braunii</i>	N/A	25-30	1,1	> 1,0	Murakami e Ikenouchi (1997)
<i>S. obliquus</i>	18	30	0,14	0,26	De Moraes et al. (2007)
<i>Spirulina</i> sp.	12	30	0,22	0,413a	De Moraes e Costa (2007)

Fonte: adaptada de Chisti (2007b) e Wang e colaboradores (2008).

N/A: valores não avaliados ou não controlados.

de irrigação em solos ricos em selênio tanto quanto as geradas durante o processamento do carvão ou do óleo podem conter altos níveis de sais inorgânicos de selênio que são contaminantes ambientais. Nesses ambientes contaminados, a volatilização de selenato por células de microalgas pode prover a biorremediação via desintoxicação.

A capacidade das microalgas de metabolizar esses compostos tóxicos pode ser aproveitada de maneira eficiente pelo homem. Neuman e colaboradores (2003) relataram que em cultivo axênico, *Chlorella* sp. metabolizou altas taxas de selenato tóxico para dimetiselênio volátil. As microalgas incubadas

com adição de 20 μmol de selenato apresentaram taxa de remoção do Se, por acumulação e volatilização, em torno de 90%. No mesmo trabalho, relatam que 87% do selenato acumulado durante 24 h foi metabolizado por redução a compostos orgânicos intermediários, tais como selenometionina e selenocisteína. Esses resultados parecem de acordo com a hipótese de que *Chlorella* pode fornecer nutrientes a base de selênio na alimentação animal, pois 1 kg de biomassa de *Chlorella* foi equivalente a 240 mg de Se, acumulando 63,5% da quantidade adicionada no cultivo (DOUCHA et al., 2009). Todavia, ainda faltam estudos de longa duração em condições de áreas contaminadas.

6.5.2 Biomassa de microalgas na nutrição animal

Entre as principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas e que têm sido amplamente exploradas comercialmente estão o enriquecimento de rações para peixes e fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana. Algumas microalgas apresentam composições químicas contendo até 55% de ácido linolênico (C18:3), como é o caso de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*), uma microalga do grupo procarioto (BROWN; MULAR; MILLER et al., 1999; MORAIS; COSTA, 2008).

Em uma revisão bibliográfica, Doucha e colaboradores (2009) destacaram fontes enriquecidas em selênio (Se), que pode ser absorvidas sob três formas: selenato e selenito de sódio (as formas inorgânicas do selênio), L-selenometionina e L-selenocisteína.

A piscicultura de água doce é, geralmente, considerada o maior empreendimento do setor na aquicultura mundial. Várias das principais espécies são consumidoras de plâncton. Este plâncton consiste principalmente de microalgas (fitoplâncton), bactérias, protozoários e zooplâncton, que crescem em represamentos de água fertilizados artificialmente.

Com exceção da *Arthrospira* (*Spirulina*), um problema encontrado com o uso da biomassa de microalgas na alimenta-

ção animal é a baixa digestibilidade, devido ao alto conteúdo de celulose da parede celular. Ruminantes, tais como ovelhas e gado, são capazes de digerir o material celulolítico sendo, portanto, possível utilizar microalgas diretamente na ração animal (BECKER, 2004a).

Em uma revisão sobre o uso da biomassa de microalgas na alimentação de animais, Spolaore e colaboradores (2006) reportaram que 30% da produção mundial de microalgas destina-se à nutrição animal (aves, bovinos, gatos, cães e aquicultura) e acima de 50% da produção de *Arthrospira* é utilizada como suplemento alimentar. Esses autores alertaram para o cuidado com as dietas por períodos prolongados e com altas concentrações de microalgas na ração animal, devido à possível ocorrência de efeitos adversos.

A ração para uso na avicultura pode conter até 5-10% de biomassa de microalgas e isso pode ter efeito positivo na coloração da pele e da gema dos ovos, devido à presença de carotenoides (BOROWITZKA, 1999; BECKER, 2004a).

Becker (2004b) mostrou que é viável substituir, em até 10%, a proteína de soja e a torta de algodão na ração de suínos pela mistura da biomassa de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. Esse autor relata, ainda, que, *Arthrospira platensis* e *Chlorella* sp. podem ser fornecidas em até 33% do total, isto é, 50% da proteína fornecida pela soja na ração, sem efeitos adversos.

6.5.3 Fixação biológica de N₂ e biofertilizantes

Entre os microrganismos fotossintetizantes, as cianobactérias destacam-se como um dos maiores grupos de produtores primários de matéria orgânica e fixadores de nitrogênio atmosférico (N₂). Diversas espécies de cianobactérias são capazes de transformar a molécula de gás N₂ em amônia, que posteriormente será assimilada em aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados existentes em suas células.

As cianobactérias são encontradas em ambientes extremos como geleiras, águas termais, salinas e até no interior de rochas. Também são capazes de estabelecer relações simbióticas com outros organismos, como plantas aquáticas e terrestres, fungos e animais (REVIERS, 2010).

A maior parte das cianobactérias que fixam nitrogênio possui células especializadas (heterocistos) que protegem a enzima nitrogenase que, por sua vez, catalisa a conversão do N_2 em amônia, tornando o N disponível (RAVEN et al., 2001). Dessa forma, as cianobactérias contribuem significativamente para a fertilização do solo, constituindo-se em uma alternativa promissora que incrementa sua biodiversidade (MARCHESAN et al., 2007).

A fixação biológica de N_2 por cianobactérias de vida livre é bastante expressiva nos ecossistemas aquáticos e agrícolas. A simbiose das cianobactérias do gênero *Anabaena* com a pteridófita *Azolla* se destaca pelo alto poder fixador de N_2 e sua importância econômica. Nos países asiáticos, essa associação tem sido empregada como adubo verde em plantações de arroz irrigado, sendo que o nitrogênio fixado por essa simbiose torna-se disponível para o arroz através da liberação desse nutriente durante o processo de decomposição da planta que ocorre após a sua incorporação no solo. Entretanto, o cultivo simultâneo também pode favorecer a cultura, embora a quantidade de nitrogênio seja menor (FIORE, 1992).

O potencial do uso das cianobactérias no ecossistema da produção de arroz depende da sua habilidade em crescer, colonizar e sobreviver. As cianobactérias podem, inevitavelmente, fornecer nitrogênio aos solos e ter sua população aumentada, se houver abundância de água e luz na superfície. O solo de arroz irrigado apresenta-se como um ambiente favorável ao crescimento e à fixação de N_2 pelas cianobactérias, atendendo às suas exigências (LYNCH, 1986). Isso porque cianobactérias como *Anabaena*, *Nostoc* e outros gêneros podem compartimentar a enzima nitrogenase em heterocistos, estru-

turas especializadas, nas quais um ambiente suficientemente reduzido é mantido e fixar N_2 em condições altamente aeróbicas (KNOWELES et al., 1994). Esses autores ainda reportam que outras cianobactérias como, por exemplo, as filamentosas *Plectonema* e *Oscillatoria* e a unicelular *Gloeocapsa* não produzem heterocistos e, geralmente, sintetizam nitrogenase em condições anaeróbicas/microaeróbicas.

Para isolamento, manutenção e distribuição de cianobactérias fixadoras de N_2 em amostras de solos agrícolas podem ser utilizadas metodologias de diluição seriada e inoculação em meios de cultura específicos (SHIELDS, 1982; KNOWELES; BARRAQUIO, 1994). A desvantagem desse método é incluir organismos que não fixam N_2 , mas são eficientes utilizadores do N_2 fixado (KNOWELES; BARRAQUIO, 1994).

Efeitos benéficos sobre a produção de grãos em diferentes condições agroclimáticas da inoculação de microalgas foram relatados, no entanto, muitos insucessos também foram observados (ROGER et al., 1985). Tal fato levou ao crescimento do número de pesquisas sobre cianobactérias em arrozais para buscar o entendimento da ecologia desses microrganismos, a fim de desenvolver práticas culturais maximizando suas contribuições: 1) a entrada de N para o ecossistema por estirpes autóctones ou inoculadas; e, 2) os outros possíveis efeitos benéficos das cianobactérias, como a produção de reguladores de crescimento de plantas (ROGER et al., 2001).

A presença de cianobactérias foi observada em 102 amostras de solos de arroz das Filipinas, Índia, Malásia e Portugal e em 22 amostras de inoculantes com base em solo desses países. Populações de algas foram quantificadas em unidades formadoras de colônias (UFC) por centímetro quadrado. *Nostoc* foi o gênero dominante na maior parte das amostras, seguido por *Anabaena* e *Calothrix*.

As algas podem aumentar o dióxido de carbono na atmosfera do solo, diminuindo o pH e solubilizando o cálcio. Além

disso, esses microrganismos podem produzir grande quantidade de polímeros extracelulares que atuam no solo como agentes agregantes (LYNCH, 1986). As cianobactérias têm sido utilizadas na agricultura como adubo verde em Tashkent, Uzbequistão, para a recuperação de solos salinos e sódico-salinos na Índia e para melhorar a estrutura do solo nas Américas do Norte e Central.

A abundância das cianobactérias foi positivamente correlacionada com o pH e o teor de P disponível nos solos. Em inoculantes à base de solo, cianófitas com heterocistos ocorreram a densidades que variaram de $4,6 \times 10^4$ - $2,8 \times 10^7$ CFU por g solo seco, compreendendo apenas uma fração moderada (média de 13%) do total de algas. Na maioria dos solos, a densidade da população nativa de cianobactérias fixadoras de N_2 , geralmente, é maior do que o alcançado pela aplicação de doses recomendadas de inóculo à base de solo. Considerando que a investigação sobre a utilização prática de cianobactérias fixadoras de N_2 foi dirigida principalmente à inoculação com estirpes exóticas, Roger e colaboradores (1987) sugeriram que também deve ser dada atenção para as práticas agrícolas que aumentam o crescimento de estirpes nativas adaptadas às condições ambientais locais.

Tiwari e colaboradores (2001) relataram ampla variação em relação ao peso seco, tempo de geração e tolerância aos biocidas de 28 estirpes de cianobactérias filamentosas e sem heterocistos isoladas de diferentes campos de arroz, pertencendo a sete gêneros, *Pseudanabaena*, *Limnothrix*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Plectonema*, *Lyngbya* e *Oscillatoria*. Essas cianobactérias filamentosas sem heterocistos possuíam tolerância ao biocida ácido 2,4-diclorofenoxiacético, Malathion e Dimecron, em doses superiores às recomendadas para a cultura de arroz. Efeito benéfico da biomassa de estirpes de microalgas e cianobactérias, de vida terrestre e água doce, foi observado em anteras de culturas de milho (*Zea mays* L.) (JÄGER et al., 2010).

Os autores mostraram que a adição da biomassa de microalgas em concentrações de 1-2 g por L melhorou a resposta androgênica e foi capaz de reduzir a quantidade de auxina sintética do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 -D) necessário.

A biomassa residual da digestão anaeróbia pode, também, ser reprocessada para fazer biofertilizantes. Além de ser renovável e sustentável, haveria o estímulo às práticas agrícolas sustentáveis (diminuindo o uso de produtos químicos) e reduzindo os custos da produção (CARDOSO, 1997).

Considerações Finais

As aplicações biotecnológicas dos cultivos microalgais e dos produtos obtidos do metabolismo desses microrganismos representam uma realidade, embora, ainda sejam necessários mais estudos sobre o tema em escala industrial.

Há um amplo mercado para pigmentos, proteínas de alta qualidade e carboidratos obtidos a partir da biomassa de microalgas e, ainda, uma imprescindibilidade na esfera ambiental e econômica para a aplicação dessa biomassa como fonte energética, produção do biodiesel a partir dos lipídeos, bioetanol e biogás. Contudo, é fundamental a seleção e a caracterização de espécies de microalgas para a obtenção dos compostos específicos que geram valor agregado e aprimorar as tecnologias para incrementar a produtividade e a extração desses compostos.

Com relação ao biodiesel, sua produção a partir de microalgas vem sendo estudada e tem-se constatado que não apenas a quantidade de lipídeos produzidos pela espécie é importante, mas também todos os fatores que influenciam o cultivo e a produção de biomassa. Ainda são necessários estudos que visem o aproveitamento da biomassa residual da extração dos metabólitos de interesse, como a utilização para biofertilizantes, alimentação animal e fermentação anaeróbica para produção de biogás (metano) e outros.

As microalgas realizam uma função ecológica essencial pela reciclagem do CO₂ e de nutrientes das águas residuais, incluindo os metais pesados, o que permite a liberação de recursos naturais reutilizáveis.

Referências

- ABURAI, N. et al. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 237-243, 2013.
- AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Chlorella**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementaryandalternativemedicine/herbsvitaminsandminerals/chlorella>>. Acesso em: 10 fev. 2014.
- AMUTHA, K. B.; MURUGESAN, A. G. Biological hydrogen production by the algal biomass *Chlorella vulgaris* MSU 01 strain isolated from pond sediment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 194-199, 2011.
- ANDRADE, M. D. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89 -113, 2008.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. General overview. In: _____. (Ed.). **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 1-34.
- BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. Chlorophylls. In: _____. (Ed.). **Handbook of natural colorants**: New Jersey: John Wiley and Sons Ltd, 2009. p. 243-254.
- BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (Ed.). **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 222-256.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, 2004. p. 312-351.

BENEMANN, J. R. Hydrogen production by microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 291-300, 2000.

BERRIOS, M.; SKELTON, R. L. Comparison of purification methods for biodiesel. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 144, n. 3, p. 459-465, 2008.

BERTOZZINI, E. L. et al. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 17-23, 2011.

BLANCO, A. et al. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 73, n. 6, p. 1259-1266, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.

BROWN, M. R. et al. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 247-255, 1999.

CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 1, p. 183-190, 2007.

CAÑIZALES-VILLANUEVA, R. O. et al. Fuentes microbianas de pigmentos. **Revista Latino-Americana Microbiologia**, México, v. 40, n. 1-2, p. 87-107, 1998.

CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenoides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 535-540, 1997.

- CARIOCA, J. O. B. Biofuels: problems, challenges and perspectives. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 5, n. 3, p. 260-273, 2010.
- CHEN, F. **Methods for production of astaxanthin from the green microalgae *Chlorella* in dark-heterotrophic cultures**. Patente n^o US7063957, jun. 20, 2006. Disponível em: <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7063957.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2014.
- CHEN, W.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 135-141, 2011.
- CHEN, W. et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2009.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- COLYER, C. L. et al. Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 3, p. 559-569, 2005.
- COOK, B. B.; LAU, E. W.; BAILEY, A. M. The protein quality of waste-grown green algae I. Quality of protein in mixtures of algae, nonfat powdered milk, and cereals. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 81, n. 63, p. 23-29, 1966.
- COOKSEY, K. E. et al. Fluorometric-determination of the neutral lipid-content of microalgal cells using Nile red. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 6, p. 333-345, 1987.
- CORDERO, B. et al. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 2, p. 341-351, 2011.
- CORDERO, B. et al. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 2, n. 18, p. 213-218, 1996.

COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 2-9, 2011.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; MCDONALD, T. M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optometry**, New York, v. 71, n. 3, p. 147-164, 2000.

DAILEY, H. A. **Biosynthesis of heme and chlorophylls**. New York: John Wiley and Sons, 1990.

DE MORAIS, M.; COSTA, J. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri* C. *vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 9, p. 1349-1352, 2007.

DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 129, n. 3, p. 439-445, 2007.

DE SCHAMPHELAIRE, L.; VERSTRAETE, W. Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 103, n. 2, p. 296-304, 2009.

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

DEL CAMPO, J. A. et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 51, n. 12, p. 2738-2749, 2010.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DOUCHA, J. et al. Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 6, p. 1001-1008, 2009.

DUNSTAN, G. A. et al. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 5, p. 71-83, 1993.

EL DIN, N.; EL-SHERIF, Z. Nutritional value of some algae from the north-western Mediterranean coast of Egypt. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 613-626, 2012.

ELTGROTH, M. L.; WATWOOD, R. L.; WOLFE, G. V. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 41, n. 5, p. 1000-1009, 2005.

FAHY, E. et al. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1811, n. 11, p. 637-647, 2011.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic photosynthesis**. Oxford: Blackwell Scientific Publishers, 1997.

FEOFILOVA, E.; SERGEEVA, Y.; IVASHECHKIN, A. Biodiesel-fuel: content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 46, n. 4, p. 369-378, 2010.

FIORE, M. D. F. Associação simbiótica com cianobactérias. In: CARDOSO, E. J. B. N. (ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo 1992 p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification the total lipides from animal tissues. **Canadian Journal of Biochemsitry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 497-509, 1956.

FONTANA, J. D. et al. Carotenoides. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 13, p. 40-45. 2000.

GAFFRON, H.; RUBIN, J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 26, n. 2, p. 219-240, 1942.

- GARDNER, R. et al. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 23, n. 6, p. 1005-1016, 2011.
- GHIRARDI, M. L. et al. Microalgae: a green source of renewable H₂. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, p. 506-511, 2000.
- GOMEZ-VILLA, H. et al. PINA. Biomass production and nutrient budget in outdoor cultures of *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyceae*) in artificial wastewater, under the winter and summer conditions of Mazatlan, Sinaloa, Mexico. **Vie et Milieu**, Paris, v. 55, n. 2, p. 121-126, 2005.
- GOODWIN, T. W. Distribution of carotenoids. **Methods in Enzymology**, New York, v. 213, n. 1, p. 167-172, 1992.
- GÖRS, M. et al. Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 265-276, 2010.
- GOUVEIA, L. et al. Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue. **Aquaculture International**, London, v. 6, n. 4, p. 269-279, 1998.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 36, n. 2, Feb, p. 269-274, 2009.
- GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. **Plant Science**, Limerick, v. 174, n. 3, p. 246-263, 2008.
- GRIFFITHS, M.; VAN HILLE, R.; HARRISON, S. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 989-1001, 2012.
- GROBBELAAR, J. Microalgal biomass production: challenges and realities. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 106, n. 1-2, p. 136-144. 2010.
- GROBBELAAR, J. Microalgae mass culture: the constraints of scaling-up. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 315-318, 2012.

- GROBBELAAR, J. U. Quality control and assurance: crucial for the sustainability of the applied phycology industry. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 209-215, 2003.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- GUEDES, C. L. B. et al. Avaliação de biocombustível derivado do bio-óleo obtido por pirólise rápida de biomassa lignocelulósica como aditivo para gasolina. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 781-786. 2010.
- GUZMÁN, H. et al. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. **Aquaculture International**, London, v. 18, n. 2, p. 189-199, 2010.
- HAIDUC, A. G. et al. SunCHem: An integrated process for the hydrothermal production of methane from microalgae and CO₂ mitigation. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 21, n. 5, p. 529-541, 2009.
- HAJIMAHMOODI, M. et al. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 43-50, 2009.
- HAJIMAHMOODI, M. et al. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 43-50, 2010.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.
- HALIM, R. et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2011.
- HANNA, M. A.; ISOM, L.; CAMPBELL, J. Biodiesel: current perspectives and future. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 64, n. 11, p. 854-857, 2005.
- HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

- HASS, M. J. et al. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 4, p. 671-678, 2006.
- HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural food colorants**. London: Blackil Academic Professional, 1996.
- HENRIQUES, N. M. et al. Dunaliella: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Biotecnologia de microalgas**, Faro, Portugal, v. 61, p. 12-18, 1998.
- HERRERA-VALENCIA, V. et al. The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 2, p. 151-157, 2011.
- HO, S. H.; CHEN, W. M.; CHANG, J. S. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 22, p. 8725-8730, 2013.
- HOSIKIAN, A. et al. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/391632>. Acesso em: 17 fev. 2014.
- HSIEH, H. J.; SU, C. H.; CHIEN, L. J. Accumulation of lipid production in *Chlorella minutissima* by triacylglycerol biosynthesis-related genes cloned from *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Microbiology**, Washington, v. 50, n. 3, p. 526-534, 2012.
- HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.
- HUNTLEY, M. E.; REDALJE, D. G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal **Mitigation and Adaptation of Strategies for Global Change**, South Melbourne, v. 12, n. 4, p. 573-608, 2007.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR). **Relatório técnico do projeto microalgas**. Londrina, 2013.
- IWASAKI, I. et al. Effect of extremely high-CO₂ stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high-CO₂' tolerant green alga, *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 44, n. 3, p. 184-190, 1998.

JÄGER, K. et al. Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 76, n. 3, p. 511-516. 2010.

KARAWITA, R. et al. Protective effect of enzymatic extracts from microalgae against DNA Damage Induced by H₂O₂. **Marine Biotechnology**, New York, v. 9, n. 4, p. 479-490, 2007.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KITADA, K. et al. Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 657-661, 2009.

KNOWELES, R.; BARRAQUIO, W. L. Free-living dinitrogen-fixing bacteria. In: MICKELSON, S. H. (ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. v. 2, pt. 2 Microbiological and Biochemical Properties, p. 179-197.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 867-873, 1993.

KRAMER, T.; KOZLOWSKI, T. **Physiology of woody plants**. New York: Academic Press, 1979.

KUCEK, K. T. et al. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 385-392, 2007.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. New York: CRC Press Taylor & Francis group, 2006.

LA FUENTE, J. C. et al. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 90-95, 2006.

LAKANIEMI, A. M. et al. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 1, p. 34. 2011.

- LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 227-242, 2003.
- LEE, S.; YOON, B. D.; OH, H. M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 12, n. 7, p. 553-556, 1998.
- LI, Y. et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 4, p. 629-636, 2008.
- LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 160-167, 2000.
- LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 12, p. 343-346, 1967.
- LOUGHLIN, P.; LIN, Y.; CHEN, M. Chlorophyll *d* and *Acaryochloris* marina: current status. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 116, n. 2-3, p. 277-293, 2013.
- LOURENÇO, S. O. Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 79, n. 1-2, p. 149-173, 2004.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas-princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006.
- LV, X. et al. Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 391, n. 1-2, p. 73-83, 2010.
- LYNCH, J. M. **Biotecnologia do Solo**. São Paulo: Manole, 1986.
- MARCHESAN, E. Desempenho do arroz irrigado em resposta à utilização de cianobactérias fixadoras de nitrogênio. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 63-68, 2007.
- MARGALITH, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 431-438, 1999.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 20-39.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MAZUR, H.; KONOP, A.; SYNAK, R. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 35-42, 2001.

MCGINN, P. et al. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 109, n. 1, p. 231-247, 2011.

MEDINA, A. R. et al. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, New York, v. 16, n. 3, p. 517-580, 1998.

MELLO, M. C. **Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenoides**. 2002. 113 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MIKE, P. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. **Energy Policy**, Surrey, v. 37, n. 9, p. 3428-3437, 2009.

MIKI, W. Biological function and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.

MILLEDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 34-41, 2011.

MORAIS, M. G. et al. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 294, n. 1-2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G. D.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1038-1042, 2008.

MOSQUERA, M. I. M.; GÁLVEZ, A. P.; MÉNDEZ, D. H. **Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples colorantes naturales**. Sevilla: Agrosic, 2005. p. 2-7.

MURAKAMI, M.; IKENOUCHI, M. The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE (2): screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 38 (Suppl 1), p. S493-S497, 1997.

NACHTIGALL, A. M. **Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de Tagetes patula L. e Calendula officinalis L.** 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed. 2011.

NEORI, A. "Green water" microalgae: the leading sector in world aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 23, p. 143-149, 2011.

NEUMANN, P. M. et al. Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 897-905, 2003.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 499-506, 2000.

OLIVAS, R. M. et al. Analytical techniques applied to the speciation of selenium in environmental matrices. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 286, n. 3, p. 357-370, 1994.

ÖRDÖG, V. et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 309-314, 2004.

OROSA, M. et al. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 5, p. 373-378, 2001a.

OROSA, M. et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 13, p. 1079-1085, 2001b.

OSGANIAN, S. K. et al. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1390-1399, 2003.

PETKOV, G. et al. A critical look at the microalgae biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 114, n. 2, p. 103-111, 2012.

PIRASTRU, L. et al. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 117-124, 2012.

POWELL, R. C.; NEVALS, E. M.; MARIONE, M. E. Algae feeding in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 75, n. 1, p. 7-12, 1961.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 287-293, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

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

- RAO, A. R. et al. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 560-564, 2007.
- RAVEN, E.; EICHHORN, E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogamed, 2001.
- REVIERS, B. Natureza e posição das algas”na árvore filogenética do mundo vivo. In FRANCESCHINI, I. M. (ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonomica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 19-57.
- RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science Ltded, 2004.
- RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.
- RODRIGUES-AMAYA, D. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 1999.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI Press, 2001.
- ROGER, P.; SANTIAGO-ARDALES, S.; WATANABE, I. Unicellular mucilaginous blue-green algae: impressive blooms but deceptive biofertilizers. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v. 10, n. 2, p. 27-28, 1985.
- ROGER, P. A.; ARDALES, S. **The blue-green algae collection at IRRI soil microbiology**. Manila: Division International Rice Research Institute, 2001. 77 p.
- ROGER, P. A. et al. The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 5, n. 2, p. 98-105, 1987.
- RYAN, D. **Biodiesel: a primer**. California: ATTRA- National Sustainable Agriculture Information Service, 2004.
- SAKAI, N. et al. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 36, n. 6-9, p. 693-696, 1995.

- SATOH, A.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO₂. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 215-224, 2001.
- SCHLUCHTER, W. M.; BRYANT, D. A. Analysis and reconstitution of phycobiliproteins: methods for the characterization of bilin attachment reactions. In: SMITH, A. G; WITTY, M. (Ed.). **Heme, chlorophyll, and bilins**. Totowa: Humana Press, 2002. p. 311-334.
- SCHMIDT, I. et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*; *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 555-571, 2011.
- SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophyll in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 29, p. 1-17, 1990.
- SCRAGG, A. H.; BONNETT, C. Inhibition of microalgal growth by silver nitrate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 169-172, 2002.
- SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2008.
- SHEER, H. **The chlorophylls**. Boca Raton: CRC Press, 1991.
- SHIELDS, L. M. Algae. In: _____. (Ed.). *Methods of soil analysis, chemical and microbiological properties*. Madison: ASA/SSSA, 1982. v. 2, p. 1091-1109.
- SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Asterdam, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.
- SINGH, U.; AHLUWALIA, A. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 73-95, 2013.
- SIRISANSANEYAKUL, S. et al. Photoautotrophic Production of Lipids by Some *Chlorella* Strains. **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 5, p. 928-941, 2011.
- SIVAKUMAR, G. et al. Bioethanol and biodiesel: alternative liquid fuels for future generations. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 10, n. 1, p. 8-18, 2010.

- SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 33, n. 2, p. 172-215, 2013.
- SPIEKERMANN, P. et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 171, n. 2, p. 73-80, 1999.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- STEVENSON, R. J.; BOTHWELL, M. L.; LOWE, R. L. **Algal**: ecology freshwater benthic ecosystems. San Diego: Academic Press, 1996.
- STIRK, W. A. et al. Cytokinin- and auxin-like activity in cyanophyta and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 215-221, 2002.
- STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.
- SU, C. H. et al. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 23, n. 5, p. 903-908, 2011.
- TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 258-267, 2013.
- TANG, D. et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 3, p. 3071-3076, 2011.
- TIWARI, O. et al. Growth potential and biocide tolerance of non-heterocystous filamentous cyanobacterial isolates from rice fields of Uttar Pradesh, India. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 291-295, 2001.
- TODD, S. J.; CAIN, R. B.; SCHMIDT, S. Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13, n. 4, p. 229-238, 2002.

TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Liquid fuel production using microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, Nagoya, v. 48, p. 251-259, 2005.

VAN GERPEN, J. et al. **Biodiesel production technology**. Colorado: NREL. Golden, 2004.

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

VERTES, A. A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Implementing biofuels on a global scale. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 7, p. 761-764, 2006.

VISSER, H.; OUYEN, J. J.; VERDOES, J. C. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam v. 4, n. 3, p. 221-231, 2003.

WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.

WEAVER, E. C.; WRIGLEY, R. **Factors affecting the identification of phytoplankton groups by means of remote sensing**. Washington: Moffet Field: NASA, 1994.

WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine Biotechnology. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 26-31, 2007.

WILLOWS, R. D. et al. Structure of chlorophyll f. **Organic Letters**, Washington, v. 15, n. 7, p. 1588-1590, 2013.

YUN, Y. S. et al. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 451-455, 1997.

ZHU, Y. et al. A simple method for extracting C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New Yor, v. 74, n. 1, p. 244-248, 2007.

ZOLOTAREVA, E. K.; SHNYUKOVA, E. I.; PODORVANOV, V. V. Microalgae as hydrogen producers. **International Journal on Algae**, New York, v. 12, n. 3, p. 199-220, 2010.

Esta publicação, *Microalgas de Águas Continentais: Potencialidades e Desafios do Cultivo*, é o primeiro volume de um conjunto de três, que foram escritos como parte das atividades do *Projeto Microalgas*, desenvolvido com o objetivo de estudar as microalgas como fonte alternativa de energia e de coprodutos de valor agregado com possibilidades de aplicações biotecnológicas.

Neste volume, por meio de revisão de literatura, são apresentados conceitos básicos sobre a biologia destes microrganismos, características dos principais grupos e metodologias para estudo, incluindo técnicas moleculares. Também são discutidos temas relativos à obtenção, isolamento e manutenção de estirpes unialgais em coleção *ex situ*. Como a obtenção de biomassa é fundamental para a aplicação tecnológica, os principais fatores ambientais que afetam o crescimento das microalgas são discutidos, juntamente com informações sobre meios de cultivo de composição variada, que podem ser utilizados em pequena ou grande escala. Para o cultivo, são discutidos sistemas potenciais, com informações sobre biorreatores, colheita e conservação da biomassa de microalgas. Ao final, são discutidos os principais produtos da biomassa microalgal e suas aplicações biotecnológicas, apresentando as atuais possibilidades de uso destes microrganismos e a grande potencialidade de desenvolvimento de novas tecnologias.



IAPAR INSTITUTO AGRÔNOMO DO PARANÁ
SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO
Rod. Celso Garcia Cid, km 375 - C. Postal 481 - 86001 970 - Londrina - PR - Brasil
Fone: 55 43 3376 2000 - Fax: 55 43 3376 2101 - www.iapar.br - iapar@iapar.br

