



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EMANUEL FRANCELINO SILVA

**CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.* EM DIFERENTES MEIOS
DE CULTURA**

FORTALEZA
2014

EMANUEL FRANCELINO SILVA

**CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.* EM DIFERENTES MEIOS
DE CULTURA**

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.

Co-orientador (a): Prof. MSc. Eveline de Alencar Costa.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S579c Silva, Emanuel Francelino.
Crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em diferentes meios de cultura / Emanuel Francelino Silva. – 2014.
46 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.
Orientação: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.
Coorientação: Profa. Me. Eveline de Alencar Costa.
1. Microalga. 2. Biotecnologia. I. Título.

CDD 660.6

EMANUEL FRANCELINO SILVA

**CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.* EM DIFERENTES MEIOS
DE CULTURA**

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. MSc. Eveline de Alencar Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. MSc. Celma de Oliveira Barbosa
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

AGRADECIMENTO

À minha família, pelo suporte incondicional que sempre me deram.

Ao orientador deste trabalho, Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

À co-orientadora, Prof. MSc. Eveline Alencar e à membro da banca, Prof. MSc. Celma Barbosa pelo fundamental apoio.

À todos os demais integrantes do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos, em especial a Natália Aquino e MSc. Ana Erbênia, pelos ensinamentos transmitidos.

À minha companheira de trabalho Yasmine Lima, que também é uma grande amiga.

À todos os amigos do curso de Biotecnologia, em especial Hugo Leite, Raíssa Novais, Cláudia Lóssio, Roberta Laiz Albano, Ítalo Gabriel, Victor Teixeira, Léo Santiago, Roberta Cristiane, Guilherme Nascimento.

Aos meus amigos Valquíria Oliveira, Francisco Brandão, Eduardo Carrá, Samilly Ribeiro, Vinícius Martins, Henrique Landi, Rodrigo Tosetto, Bruna Cavalcante, Rafaela Chaves, Ricardo Costa e Thiara Oliveira.

Aos professores do curso de bacharelado em Biotecnologia da UFC, pela dedicação.

À Universidade Federal do Ceará pelo suporte a minha formação.

Aos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares aquáticos, de bastante interesse biotecnológico. Possuem altos teores de proteínas, lipídeos e carboidratos se comparados a outras fontes de alimentos, além de um alto teor de pigmentos, importantes para a indústria. Apresentam ainda grande potencial produção de biocombustíveis, em substituição aos combustíveis fósseis. O cultivo de microalgas apresenta grande versatilidade, entretanto, requer o controle de diversos fatores como intensidade luminosa, temperatura, pH e concentração de nutrientes no meio. Neste estudo, foram avaliados o crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em quatro diferentes meios de cultivo, em bancada e com aeração contínua, por meio da construção da curva de crescimento baseada nos parâmetros de densidades celular e óptica. Observou-se que os meios WC e NPK (16:08:32) apresentaram crescimento mais expressivo, tendo também a maior variação de pH dentre os meios testados, em decorrência do maior consumo de CO₂ devido a uma maior taxa de atividade fotossintética. Os meios NPK (19:19:19) e NPK (12:43:12) não apresentaram crescimento satisfatório. O presente trabalho permitiu a compreensão dos processos do cultivo de microalgas em bancada, e contribui para o desenvolvimento de novas estratégias visando um melhor aproveitamento das potencialidades das microalgas.

Palavras-chave: Microalgas, Cultivo, Biotecnologia.

ABSTRACT

Microalgae are aquatic unicellular organisms, which have attracted much biotechnological interest. These organisms have high protein, lipids and carbohydrates content if compared to other food sources, besides a high pigment content, which are important to the industry. They also show much potential regarding biofuel production, which are to replace fossil fuels. Microalgae cultivation shows versatility, but it requires the control of parameters like light intensity, temperature, pH and nutrient concentration on medium. On this study, the growth of *Scenedesmus sp.* was evaluated in four different culture media, on bench scale and continuous aeration, through the construction of the growth curve, based on cellular and optical density. It was observed that WC and NPK 16:08:32 showed better growth, compared to the other media. WC and NPK 16:08:32 also showed the biggest pH variation between the tested media due to its higher CO₂, which happens due to higher photosynthetic activity rates. NPK (19:19:19) and NPK (12:43:12) didn't show satisfactory growth. This study allowed the comprehension of the processes related to the bench scale cultivation of this microalgae, and also contributes to new strategies development in order to achieve a better exploration of microalgae potential.

Key words: Microalgae, Cultivation, Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	A microalga <i>Scenedesmus sp.</i> vista em microscópio óptico. (400x)..	22
Figura 2 –	Visão geral das condições de cultivo.....	25
Figura 3 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio WC aerado a partir da densidade celular.....	28
Figura 4 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio WC aerado a partir da densidade óptica.....	29
Figura 5 –	Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio WC.....	29
Figura 6 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio definido NPK (16:08:32) aerado a partir da densidade celular.....	31
Figura 7 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio definido NPK (16:08:32) aerado a partir da densidade óptica.....	31
Figura 8 –	Sedimentação de biomassa de <i>Scenedesmus sp.</i>	32
Figura 9 –	Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio NPK definido (16:08:32).....	32
Figura 10 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio definido NPK (19:19:19) aerado a partir da densidade celular.....	34
Figura 11 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio definido NPK (19:19:19) aerado a partir da densidade óptica.....	34
Figura 12 –	Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio NPK definido (19:19:19).....	35
Figura 13 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio definido NPK (12:43:12) aerado a partir da densidade celular.....	36
Figura 14 –	Curva de crescimento de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> em meio definido NPK (12:43:12) aerado a partir da densidade óptica.....	37
Figura 15 –	Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio NPK definido (12:43:12).....	37
Figura 16 –	Densidades celulares obtidas pelos quatro cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i>	38
Figura 17 –	Densidades ópticas obtidas pelos quatro cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição geral entre fontes usuais de alimentação humana e algas (% biomassa seca).....	15
Tabela 2 – Comparação entre rendimento de óleo e demanda de terra para cultivo de algumas fontes de biodiesel.....	19
Tabela 3 – Teor de óleos de algumas microalgas.....	20
Tabela 4 – Macronutrientes e suas respectivas funções biológicas.....	22
Tabela 5 – Composição dos meios de cultura utilizados	24
Tabela 6 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivadas em meio WC, e nas equações 1 a 3.....	30
Tabela 7 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivadas em meio definido NPK (16:08:32), e nas equações 1 a 3.....	33
Tabela 8 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivadas em meio definido NPK (19:19:19), e nas equações 1 a 3.....	35
Tabela 9 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivadas em meio definido NPK (12:43:12), e nas equações 1 a 3.....	38
Tabela 10 – Variação de pH registrada ao longo quatro cultivos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados, do inglês <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
DHA	Ácido docosahexaenoico
m	Litro
ha	Hectare
pH	Potencial Hidrogeniônico
ATP	Adenina Trifosfato
WC	<i>Water culture</i>
NPK	(Nitrogênio:Fósforo:Potássio), do inglês (Nitrogen:Phosphorus:Potassium)
PADETEC	Parque de desenvolvimento tecnológico/UFC
UFC	Universidade Federal do Ceará
mL	Mililitro
mm	Milímetro
W	Watts
lux	Iluminância
nm	Nanômetro
C	Concentração
V	Volume
r	Taxa de crescimento
n_t	Número de células no final do intervalo de tempo
n_0	Número de células no início do intervalo de tempo
Δt	Intervalo de tempo
T_2	Tempo de duplicação
k	Número de divisões binárias por dia

LISTA DE SÍMBOLOS

- °C Graus Celsius
- % Porcentagem
- ω Ômega
- ® Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Algas	14
2.1.1	Microalgas	14
2.1.1.1	<i>Aplicações Biotecnológicas das microalgas</i>	15
2.1.1.2	<i>Cultivo de Microalgas</i>	20
2.1.1.3	<i>Necessidades Nutricionais das Microalgas</i>	21
2.1.1.4	<i>Scenedesmus sp.</i>	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivos Gerais	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Crescimento da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio WC	28
5.2	Crescimento da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio NPK (16:08:32)	30
5.3	Crescimento da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio NPK (19:19:19)	33
5.4	Crescimento da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em meio NPK (12:43:12)	36
5.5	Comparação entre os meios de cultura avaliados	38
5.6	pH	40
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A industrialização e o uso descontrolado dos recursos naturais têm levantado sérias preocupações sobre meio ambiente terrestre. Estas atividades vêm contribuindo com o drástico aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, tornando urgente a necessidade de se neutralizar os efeitos deste composto no ar. O aumento populacional e as mudanças no estilo de vida das pessoas torna a redução do consumo de energia uma opção praticamente inviável.

Por isso, diversas outras alternativas para obtenção de energia vêm sendo estudadas. Neste contexto, as microalgas surgem como uma alternativa para a produção de biocombustíveis, sobretudo devido à sua alta capacidade fotossintética e ao seu rápido crescimento. Além disso, as microalgas constituem importantes fontes de proteínas e carboidratos, além de pigmentos, como o caroteno, de alto valor agregado para a indústria.

Apesar dos cultivos de microalgas apresentarem uma grande versatilidade, existem ainda importantes gargalos a serem solucionados para uma melhor produção de biomassa, e conseqüentemente, melhor aproveitamento das suas vantagens. Os custos de produção de biomassa algal ainda são considerados elevados, e as metodologias de extração de óleos usuais atualmente também são dispendiosas e demoradas.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em diferentes meios de cultivo nomeadamente os meios WC, NPK (16:08:32), NPK (19:19:19) e NPK (12:43:12), identificando as diferentes fases do crescimento.

Para a otimização do cultivo de microalgas é necessário, portanto, conhecer as todas etapas do seu crescimento, e os fatores que afetam seu crescimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Algas

Alga é um termo utilizado para denominar um grupo de organismos heterogêneos, com enorme variedade morfológica, fisiológica e reprodutiva. Estão presentes em ambientes de água doce, tais como lagos e rios, onde existem como microorganismos, sendo visíveis apenas com o auxílio de um microscópio óptico.

Constitui um grupo de organismos simples, sem diferenciação em raízes, caules e folhas. Em termos de fisiologia, são fundamentalmente autotróficos e sintéticos. Algumas algas tornaram-se, posteriormente, heterotróficas.

O Termo *Algae* não apresenta significado taxonômico, mas é utilizado mundialmente para designar os diversos filos que se encaixam na descrição acima, podendo ser organismos tanto procariontes, como eucariontes. (LOURENÇO, 2006)

2.1.1 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares, de estrutura celular procariótica, tais como os representantes das divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*, ou eucariótica, como os representantes das Divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae* etc.), *Cryptophyta* e *Dinophyta*. (HOEK *et al.*, 1995) divididos em diferentes grupos com base em sua taxonomia, incluindo azul-verde, verde, verde-amarelo, vermelho, marrom e algas douradas.

Elas existem tanto na forma de células individuais como também podem agrupar-se em cadeias de células. As várias espécies de microalgas apresentam diferenças estruturais e morfológicas entre si. Entretanto, são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas (ABALDE *et al.*, 1995).

As diversas espécies de microalgas podem viver em ambientes de água doce, água salgada ou em águas residuais. Elas também podem ser classificadas com base no fornecimento de carbono. As microalgas que usam carbono inorgânico como o CO₂ são denominadas autotróficas, sendo capazes de realizar a fotossíntese usando a luz como fonte de energia. Já as microalgas heterotróficas utilizam

carbono orgânico (GIDDEY *et.al.*, 2012; HO *et. al.*, 2012). As espécies que utilizam ambas as fontes de carbono, orgânicos e inorgânicos, são chamadas mixotróficas (OGAWA *et.al.*, 1981).

2.1.1.1 Aplicações Biotecnológicas das Microalgas

As microalgas têm sido amplamente utilizadas na aquicultura, sendo importantes fontes de alimentação de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos outros organismos que possuem notável interesse econômico.

Elas são capazes de aumentar o valor nutritivo de alimentos convencionais, influenciando de maneira positiva a saúde de seres humanos e animais. O teor de lipídeos, proteínas e carboidratos merecem destaques, principalmente quando comparados a alimentos usualmente consumidos. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre as composições gerais de fontes alimentares para humanos com diferentes espécies de algas. Os teores de proteínas e carboidratos chegam a aproximadamente 60% em algumas espécies de microalgas, o de lipídeos a 22% (BECKER, 1994).

Tabela 1 – Composição geral entre fontes usuais de alimentação humana e algas (% biomassa seca)

Fontes de alimentos/Microalgas	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos
Fermento biológico	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cilyndrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Fonte: Adaptado de BECKER (1994).

a. Proteínas

Segundo Becker (1994), algumas espécies de microalgas apresentam teor de proteínas de até 71%, e teor de lipídeos de até 22% de biomassa seca. O elevado teor de proteínas de várias espécies de microalgas é uma das principais razões para considerá-las como uma fonte não convencional de proteína (CORNET, 1998; SOLETTO *et al.* 2005). Ao passo que as células são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, podem fornecer os que são essenciais para os seres humanos e os animais (GUIL GERRERO *et al.* 2004).

b. Lipídeos

As microalgas possuem alta capacidade de acúmulo de lipídeos sob condições específicas, como em meios com alto teor de carbono e nitrogênio, e também sob condições de estresse. Os lipídeos obtidos a partir das microalgas são classificados em dois tipos, de acordo com seus respectivos números de carbono: ácidos graxos contendo entre 14 e 20 carbonos, que são utilizados para a produção de biodiesel, e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) com mais de 20 carbonos, utilizado como suplementos alimentares. Dois parâmetros são geralmente considerados para a avaliação da acumulação de lípidos para a produção de biocombustíveis: um é o teor de lípidos (porcentagem de lípideo por peso seco da biomassa), e a outra é a produtividade de lipídeos (quantidade de lípideo produzido por litro de volume de trabalho por dia). Tanto a velocidade de produção quanto o teor de lipídeos da biomassa devem ser examinados em simultâneo para garantir uma produção de lipídeos de microalgas mais eficiente (VOLKMAN *et al.*, 1989; ZHUKOVA & AIZDAICHER, 1995; ROBLES MEDINA *et al.*, 1998)

Em contraste, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) com mais de 20 átomos de carbono são compostos de alto valor agregado para a produção de alimentos funcionais, pois são nutrientes essenciais que não podem ser sintetizados pelos organismos eucariotos superiores. Dentre todos os PUFAs microalgais disponíveis comercialmente, o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5, ω -3) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6, ω -3) possuem altos níveis de bioatividade e portanto, são de particular interesse. Estudos têm demonstrado que as microalgas

podem conter grandes quantidades de EPA e de DHA de alta qualidade e portanto, são considerados uma excelente fonte destes compostos de elevado valor (VAZHAPPILLY;CHEN, 1998; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Diversos cultivos de microalgas têm sido feitos visando a obtenção de compostos nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico – EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.), que apresentam propriedades terapêuticas (GILL; VALIVETY, 1997; TRIPATHI *et al.*, 1999). Atualmente, produtos derivados de algas são comercializados como alimentos naturais ou suplementos alimentares, estando disponíveis formulações em pó, em tabletes, em cápsulas ou em extratos. São também incorporados em produtos da indústria alimentícia no geral, tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais (BECKER, 2004; PULZ; GROSS, 2004).

c. Carboidratos

As algas têm elevada taxa de acúmulo de carboidratos, podendo chegar a 50% do seu peso seco. (HO *et al.*, 2012). De maneira geral, os carboidratos contidos nas microalgas são compostos principalmente de amido, celulose, glicose/hemiceluloses e diversos tipos de polissacarídeos. Destes, amido e glicose de microalgas são convencionalmente utilizados para a produção de biocombustíveis, especialmente o bioetanol (JOHN, 2011) e hidrogênio. (CHOCHOIS *et al.*, 2009).

Já os polissacarídeos desempenham funções importantes como as de armazenamento e também atuam como moléculas de proteção e estruturais. Recentemente, polissacarídeos de microalgas têm chamado a atenção pelo potencial para serem utilizados como novos materiais bioativos, devido às suas estruturas e funções biológicas distintas. Estes polissacarídeos constituem, portanto, uma classe de compostos de alto valor agregado, com muitas possibilidades de aplicações em indústria de alimentos, cosméticos, produtos têxteis, estabilizantes, emulsificantes, lubrificantes, agentes espessantes e drogas clínicas (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010).

Embora o mecanismo farmacêutico dos polissacarídeos de algas ainda seja alvo de pesquisas, os mecanismos básicos de seus efeitos terapêuticos são baseados na estimulação de macrófagos e na sua modulação. Por via de regra, a atividade biológica de polissacarídeos sulfatados muda com a sua composição de açúcar e grau de sulfatação. Polissacarídeos sulfatados de algas têm exibido uma vasta gama de atividades farmacológicas, incluindo a atuação como antioxidantes, antitumorais, anticoagulantes, antiinflamatórios, antivirais e agentes imunomoduladores (KIM *et al.*, 2012).

d. Pigmentos

Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa de microalgas são as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE *et al.*, 1995). É possível, por meio da indução de algum tipo de estresse, por exemplo, incrementar a produção de alguns desses três tipos de pigmentos (BOROWITZKA, 1993).

Os carotenóides atuam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários. Cada espécie de microalga pode conter entre 5 e 10 tipos de um universo de aproximadamente 60 diferentes carotenóides presentes nas células de microalgas. Diversas espécies podem acumular grande concentração de betacaroteno, astaxantina ou cantaxantina, os quais têm uma ampla aplicação como corantes naturais e como antioxidantes combatendo a formação de radicais livres e conseqüentemente, prevenir doenças degenerativas, combatendo a formação de radicais livres e funcionando como agentes antitumorais e estimulantes do sistema imunológico. (OROSA *et al.*, 1997; BAKER; GUNTER, 2004; PULZ; GROSS, 2004),

Os corantes naturais obtidos a partir das microalgas são mais resistentes à presença de ácido ascórbico, ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades (SKULBERG, 2004). A rígida regulamentação para a aplicação de corantes sintéticos, na indústria de alimentos, estimula pesquisas visando o desenvolvimento produtivo e ao uso de carotenóides microalgais como aditivo alimentar (CAMPO *et al.*, 2000).

e. Biodiesel

A alta eficiência fotossintética faz das microalgas excelentes fontes para a produção de biodiesel. Através da fotossíntese, as plantas usam o CO₂ como fonte de carbono e o converte em carboidratos. Estes carboidratos podem, por sua vez, serem convertidos em biocombustíveis, por meio de processos químicos ou bioquímicos. Esse alto rendimento fotossintético faz com que o cultivo de microalgas seja menos competitivo com a produção de alimentos, requerendo menos terra para o cultivo como se observa na Tabela 2, além de apresentar um melhor controle das emissões de gases terrestres, fazendo das microalgas uma excelente alternativa frente a fontes de biodiesel que requerem mais áreas de terra (CHISTI, 2007).

Tabela 2 – Comparação entre rendimento de óleo e demanda de terra para cultivo de algumas fontes de biodiesel

Cultura	Rendimento do óleo (L/ha)	Área de terra requerida (M /ha) para o cultivo^a
Milho	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
Jatropha	1892	140
Coco	2689	99
Óleo de palma	5950	45
Microalga ^b	136,900	2
Microalga ^c	58,700	4.5

^a Para atender a 50% de todas as necessidades de combustível de transporte dos Estados Unidos

^b 70% de óleo na biomassa

^c 30% de óleo na biomassa

Fonte: Adaptado de CHISTI (2007).

Além disso, as microalgas requerem menos água e nutrientes em comparação com as culturas terrestres e podem crescer tanto em águas residuais domésticas como industrial, utilizando nitrogênio e fósforo como fontes de nutrientes. Em termos de rendimento de óleo, apresentam produtividade vinte vezes maior do que plantas oleaginosas. Elas podem crescer rapidamente e o seu tempo de duplicação varia entre 3,5 horas durante o período de crescimento exponencial a 24 horas, resultando em elevada produção de biomassa em curto espaço de tempo.

O teor de óleo contido nas microalgas pode ser superior a 80% em peso de biomassa seca. Níveis de óleo entre 20% e 50% são bastante comuns em diversas espécies de microalgas, conforme se observa na Tabela 3. A taxa de produtividade de óleo, que é a massa de óleo produzida por unidade de volume do caldo de cultura de microalgas, por dia, depende da taxa de crescimento de algas, e o teor de óleo da biomassa (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Teor de óleos de algumas microalgas

Microalga	Teor de óleo (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cylindrontheca sp.</i>	16-37
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Fonte: Adaptado de Lourenço (2006).

Diante disso, ressalta-se que os biocombustíveis à base de microalgas têm sido reconhecidos como a terceira geração de energia de biomassa e a única fonte renovável atual de óleo que pode de fato, atender a demanda global por combustíveis para transporte.

2.1.1.2 Cultivo de Microalgas

Alguns aspectos devem ser levados em consideração no que diz respeito ao cultivo de microalgas. A correta interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes pode contribuir para a otimização do cultivo, pois o crescimento de microalgas deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas (DUARTE, 2001). O pH do meio também é importante no

processo de cultivo, variando de neutro a alcalino para a maioria das espécies de microalgas (MIAO; WU, 2004; RAVEN, 1990).

Um fator limitante quando se trata de meio de cultura sintético é o alto custo dos nutrientes. No caso de cultivos em meios alternativos (resíduos industriais ou agrícolas), os fatores condicionantes para a produção de biomassa são luz, temperatura e agitação da cultura e merecem ser controlados de acordo com a espécie cultivada (DUARTE, 2001). A luz é fundamental para o crescimento das microalgas, pois atua como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa (LACAZ-RUIZ, 1996). A luminosidade induz a atividade enzimática, influenciando a síntese de proteína (RUYTERS, 1984; UMINO; SATOH; SHIRAIWA, 1991). Entretanto, luminosidade em excesso pode ser letal para as células devido a formação de peróxido de hidrogênio, que é tóxico para as microalgas na presença de oxigênio. Tal reação é denominada foto-oxidação ou morte foto-oxidativa (HIRAYAMA; UEDA; SUGATA, 1996).

Quanto aos métodos de cultivos de microalgas, eles podem ser realizados em sistemas abertos, tais como lagos, tanques ou piscinas, ou ainda em sistemas fechados como fotobiorreatores. Um fotobiorreator é um reator em que organismos fotossintetizantes são cultivados ou utilizados para realizar uma reação biológica. Propiciam um maior controle das condições, além de necessitarem de menos espaço que os sistemas abertos e serem mais eficientes (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

2.1.1.3. Necessidades Nutricionais

Os ambientes aquáticos são ricos em diversos nutrientes, mas apesar de haverem diversos elementos químicos dissolvidos nas águas de mares e rios, a distribuição dos mesmos não ocorre de maneira homogênea. Assim, enquanto muitos componentes estão presentes de maneira abundante, outros apresentam baixa disponibilidade. A utilização de meios de cultivo pode contornar esse problema, uma vez que a concentração de nutrientes pode ser controlada. A Tabela 4 apresenta os principais macronutrientes que devem estar dissolvidos nos meios de cultivos de microalgas (LOURENÇO, 2006).

Tabela 4 – Macronutrientes e suas respectivas funções biológicas

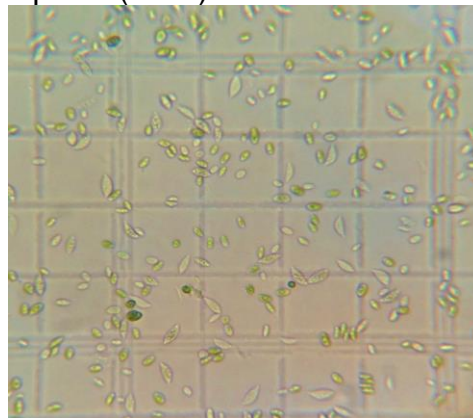
Componente	Função biológica
Carbono	Componente estrutural das macromoléculas
Nitrogênio	Componente estrutural das macromoléculas
Fósforo	Realização de processos de troca energética (ATP)
Potássio	Regulação osmótica
Magnésio	Constituinte da molécula de clorofila
Enxofre	Estruturação de proteínas, como cisteínas e metioninas
Ferro	Participação na via de biossíntese da clorofila

Fonte: Adaptado de Lourenço (2006).

2.1.1.4 *Scenedesmus sp.*

A microalga *Scenedesmus sp.* (Figura 1) é a mais comum e cosmopólita dentre as algas verdes (*Chlorophytas*). Costumam formar colônias com 4, 8 ou até 16 células. É uma microalga bastante presente nos plâncton de água doce. Sua reprodução ocorre por esporulamento, através de esporos sem mobilidade (autósporo) (BICUDO; MENEZES, 2005).

Figura 1 – A microalga *Scenedesmus sp.* vista em microscópio óptico. (400x)



Fonte: Autor

São muito ricas em óleo, com algumas espécies podendo chegar a 55% de teor de lipídeos em sua composição. Apresentam elevadas taxas de duplicação, sendo por isso ótimas candidatas à produção de biocombustíveis (AMARO; GUEDE; MALCATA, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Realizar cultivos de uma espécie de microalga do gênero *Scenedesmus* sp. em meios diversos, determinando as respectivas curvas de crescimento de modo a conhecer as etapas (fases) do seu crescimento, comparando-as entre si.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meios de cultura diferentes: WC, NPK (16:08:32), NPK (19:19:19) E NPK (12:43:21) em sistema de bancada por meio da curva de crescimento;
- Determinar as fases de crescimento de *Scenedesmus* sp. pelos parâmetros de densidade celular e densidade óptica;
- Realizar acompanhamento da variação de pH nas etapas da curva de crescimento dos diferentes meios;
- Analisar as respectivas curvas de crescimento com base nos parâmetros de densidade celular e densidade óptica, correlacionando com a reta de regressão, no intuito de determinar um meio de cultivo mais eficiente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente, foi realizada a preparação do laboratório e do local de cultivo, além da desinfecção dos equipamentos a serem utilizados. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos, no Parque de desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Foram preparados os meios de cultura: WC e NPK (Nitrogen:Phosphorus:Potassium) nas proporções mássicas de 16:08:32, 19:19:19 e 12:43:12, cuja composições estão resumidas na Tabela 5. Os meios tiveram seus respectivos pHs corrigidos para 7,0, ideal para o crescimento da microalga em estudo. Os meios foram então desinfectados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tabela 5 – Composição dos meios de cultura utilizados

Meio	Reagentes	Quantidade/L
WC	CaCl ₂ . 2H ₂ O	1 mL
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 mL
	Na ₂ HCO ₃	1 mL
	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	1 mL
	NaNO ₃	1 mL
	NaSiO ₃	1 mL
	Solução de metais traço	1 mL
	Solução de micronutrientes	1 mL
	Solução de vitaminas	1 mL
NPK (16:08:32)	(NH ₂) ₂ CO	16 g
	Superfosfato simples	8 g
	K ₂ SO ₄	32 g
NPK (19:19:19)	(NH ₂) ₂ CO	19 g
	Superfosfato simples	19 g
	K ₂ SO ₄	19 g
NPK (12:43:12)	(NH ₂) ₂ CO	12 g
	Superfosfato simples	43 g
	K ₂ SO ₄	12 g

Fonte: Adaptado de OSHE (2009).

As cepas utilizadas foram obtidas apartir do estoque do próprio Laboratório onde se deu o experimento. Para a inoculação, foi feita a contagem do sistema-mãe, e coletado um volume com concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mm, segundo Lourenço (2006):

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

onde:

C_1 = concentração do cultivo-mãe.

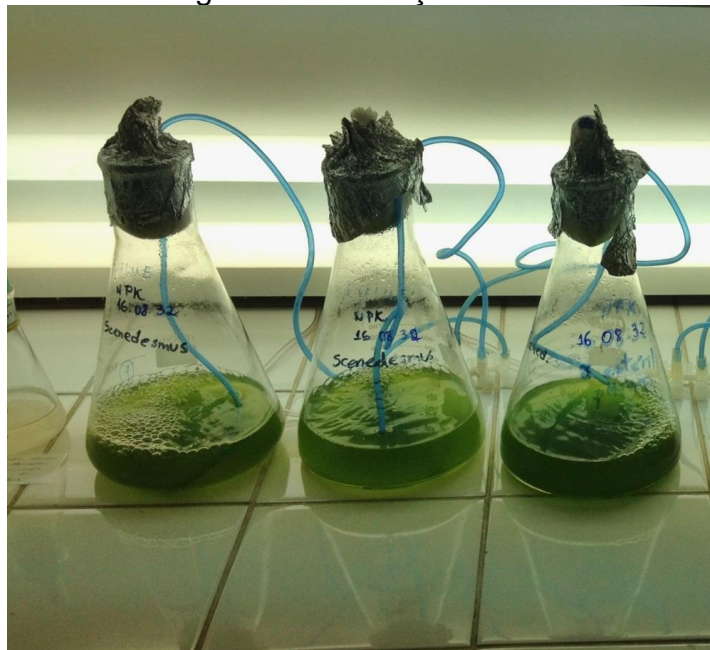
V_1 = volume a ser inoculado.

C_2 = concentração pretendida

V_2 = Quantidade de meio pretendida.

O experimento foi realizado sob temperatura controlada de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, garantido por lâmpadas fluorescentes de 40W, totalizando uma iluminância de 7000 lux (Figura 2). Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 600 mL, em triplicata, com fornecimento contínuo de oxigênio (aerado). O experimento foi realizado de agosto a novembro de 2014.

Figura 2 – Visão geral das condições de cultivo.



Fonte: Autor

A avaliação do crescimento microalgal se deu pela construção da curva de crescimento baseando-se na avaliação da densidade celular, e também pelo monitoramento da densidade óptica. Para isso, alíquotas de 30 mL foram retiradas diariamente, numa mesma faixa de horário. Dessa alíquota, 3 mL foram retiradas e submetidas a leituras das respectivas absorbâncias em espectrofotômetro (SPECTRONIC®20 GENESYS) em comprimento de onda de 540 nanômetros por ser um comprimento de onda não absorvido pelas clorofilas a e b, presentes nas células (MIRANDA, 2011, SANTOS, 2013).

A densidade celular foi determinada por contagem direta em microscópio óptico (OPTON TIM-108) utilizando uma câmara de Neubauer, que consiste numa espessa lâmina de vidro para microscopia. Sua parte central é composta por compartimentos divididos em 9 quadrados de contagem, de 1 mm² de área cada. Uma pequena alíquota da cultura foi colocada entre a lamínula e câmara de Neubauer, com cuidado para não haver transbordamento da amostra nos sulcos existentes. A câmara foi colocada no microscópio, em aumento de 400X. A contagem foi realizada dos 4 quadrantes das pontas, e no quadrante central, conforme metodologia descrita por Lourenço (2006).

A partir dos dados de densidade celular obtidos, foram investigados outros parâmetros, tais como taxa de crescimento, número de divisões por dia e tempo de duplicação, segundo Lourenço (2006).

A taxa de crescimento é dada por r , e é definido pela fórmula:

$$r = \ln(N_t/N_0)/\Delta t$$

onde:

r = taxa de crescimento;

N_t = número de células no final do intervalo de tempo;

N_0 = número de células no início do intervalo de tempo;

Δt = intervalo de tempo (dias);

A taxa de crescimento pode ser convertida em número de divisões binárias por dia, sendo representado por k e determinado pela fórmula, segundo Lourenço (2006):

$$k = r/0,6931$$

Para um melhor monitoramento do crescimento da cultura, também é importante estimar o tempo necessário para que a população de microalgas duplique a sua densidade, através do cálculo de T_2 (tempo de duplicação) que se dá por meio da fórmula, segundo Lourenço (2006):

$$T_2 = 0,6931/r$$

Foi realizada ainda uma análise estatística dos dados de densidades ópticas e celulares, por meio da correlação entre as variáveis obtidas, através da construção de uma reta de regressão linear.

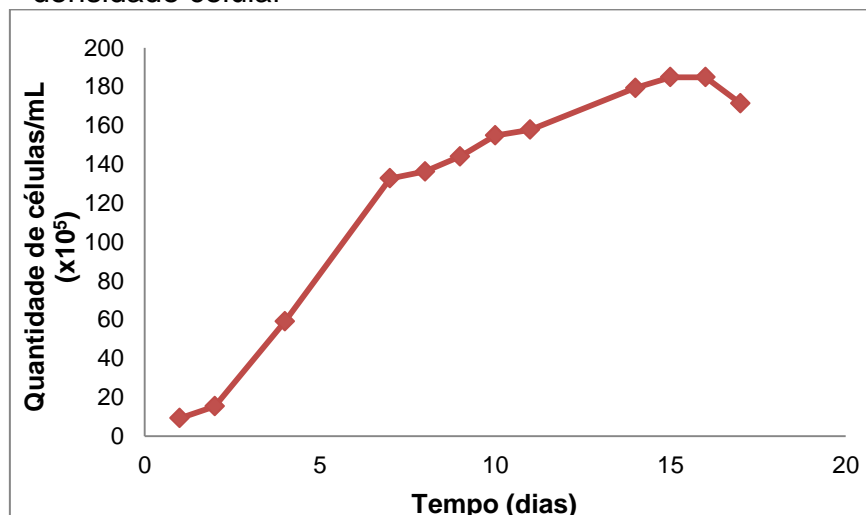
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em meio WC com aeração

Foi construída a curva de crescimento da microalga *Scenedesmus* em meio WC, utilizando dados de densidade celular, a partir de contagens no microscópio óptico (Figura 3) e densidade óptica, obtidos a partir da medida da absorbâncias em espectrofotômetro a 540 nm (Figura 4).

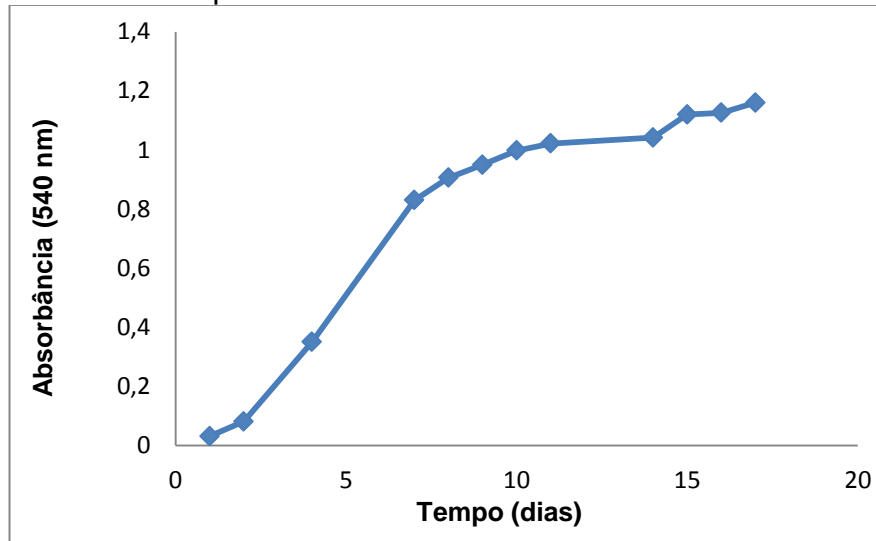
A maior densidade celular foi exibida pela cultura por no 15º dia (Densidade máxima celular, DMC), quando registrou $185,8 \times 10^6$ células por mililitros de meio. Após uma fase de indução do cultivo (LAG), que dura um dia, observa-se também um rápido crescimento entre o segundo e o sétimo dia, de $15,3 \times 10^5$ para $132,7 \times 10^5$ cel/mL, caracterizando a fase de crescimento exponencial da alga. Em seguida, observa-se a fase de crescimento estacionário. Não foi possível observar a fase de declínio e morte das microalgas antes do encerramento do cultivo, em decorrência do tempo destinado para tal, e do esgotamento do próprio meio de cultura.

Figura 3 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio WC aerado a partir da densidade celular



Fonte: O autor

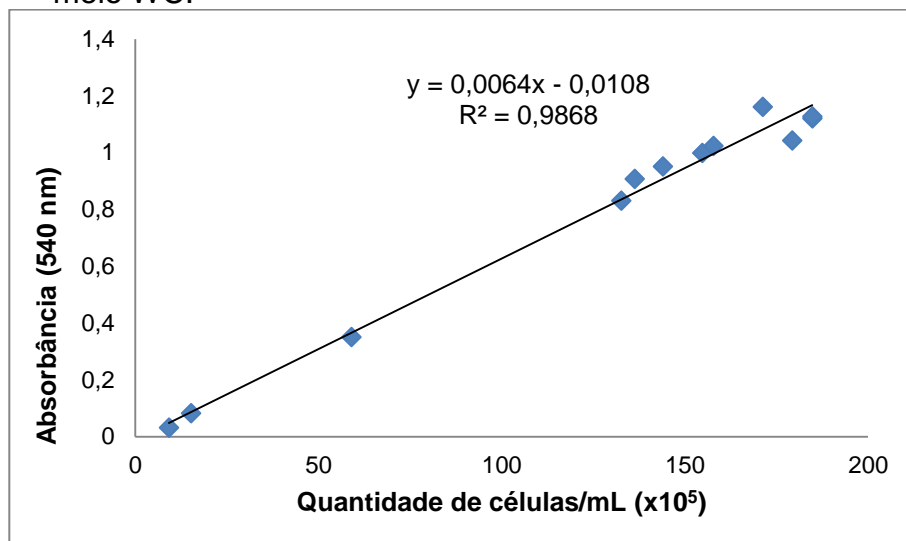
Figura 4 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio WC aerado a partir da densidade óptica



Fonte: O autor

Conforme a equação da reta de regressão entre as densidades ópticas das culturas e as densidades celulares de *Scenedesmus sp.* (Figura 5), houve um grau de correlação positiva entre as duas variáveis estudadas no cultivo em meio WC, pois a regressão estava em torno de 0,9868, valor próximo de 1. Isso demonstra que o experimento ocorreu em condições controladas.

Figura 5 – Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* em meio WC.



Fonte: O autor

Os dados de densidade celular obtidos permitiram que a análise de outros parâmetros de crescimento, resumidos na tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* cultivadas em meio WC, e nas equações 1 a 3.

Dias	1-2	2-4	4-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-14	14-15	15-16
N_2/N_1	1,66	3,86	2,25	1,03	1,06	1,08	1,02	1,14	1,03	1
$\ln N_2/N_1$	0,51	1,35	0,81	0,03	0,06	0,08	0,02	0,13	0,03	0
$\log_2(N_2/N_1)$	0,73	1,94	1,17	0,04	0,09	0,12	0,03	0,18	0,04	0
Δt (dias)	1	1	3	1	1	1	1	3	1	1
r	0,51	1,35	0,27	0,03	0,06	0,08	0,02	0,04	0,03	0
K	0,73	1,94	0,39	0,04	0,09	0,12	0,03	0,06	0,04	0
T_2	1,36	0,51	2,57	23,15	11,58	8,68	34,73	17,36	23,15	0

r – taxa de crescimento; k – número de divisões por dia; T_2 – tempo de duplicação da população

Fonte: Autor.

Até o sétimo dia, a cultura apresenta taxas de crescimento elevadas, bem como altos valores de divisões por dia. A partir do sétimo dia, esses valores tornam-se mais baixos, ao passo em que se observa um aumento no tempo necessário para que haja a duplicação da população, que atinge seu máximo valor nos intervalos 8 e 9, e 14 e 15.

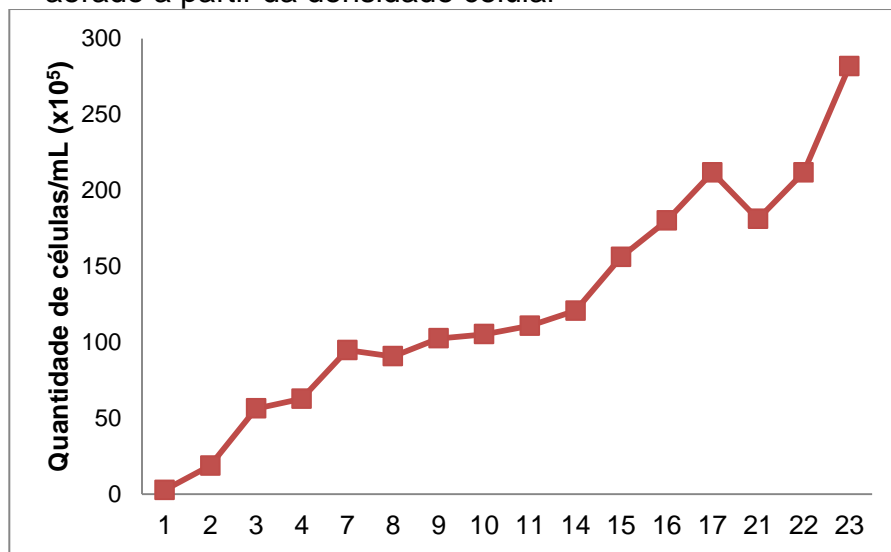
5.2 Crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em meio definido NPK (16.08.32) com aeração

Foi construída também a curva de crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em meio NPK nas concentrações massais (16:08:32), utilizando dados de densidade óptica (Figura 6) e de densidade celular (Figura 7).

Nota-se nos dois primeiros dias a fase de indução do crescimento, e após isso, a fase de crescimento exponencial é observada. A densidade celular máxima é alcançada no último dia de cultivo, quando atinge o valor de $281,72 \times 10^5$ células por mililitro. Foi possível observar neste dia a excessiva deposição de material da microalga nas paredes internas do erlenmeyer, resultantes do processo de

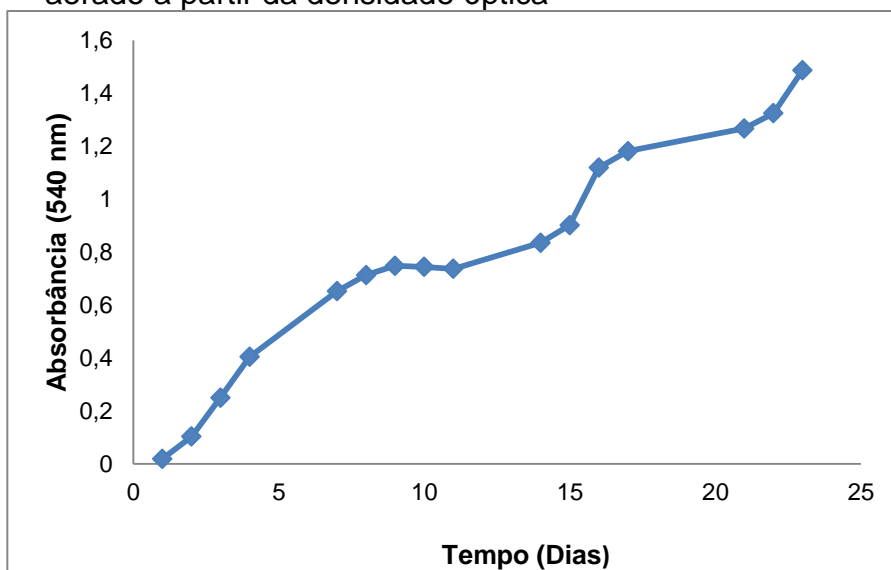
autofloculação da mesma (Figura 8). Os valores de absorbância a partir do décimo dia de cultivo tornam-se muito instáveis, em decorrência das partículas da microalga em suspensão, que interferem na leitura. A deposição de biomassa acaba por prejudicar o crescimento das microalgas, pois o que resulta na redução da quantidade de luz que penetra no cultivo, acarretando assim prejuízos às células em crescimento. (CORRÊA, 2013)

Figura 6 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio NPK definido (16:08:32) aerado a partir da densidade celular



Fonte: Autor

Figura 7 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio NPK definido (16:08:32) aerado a partir da densidade óptica



Fonte: Autor

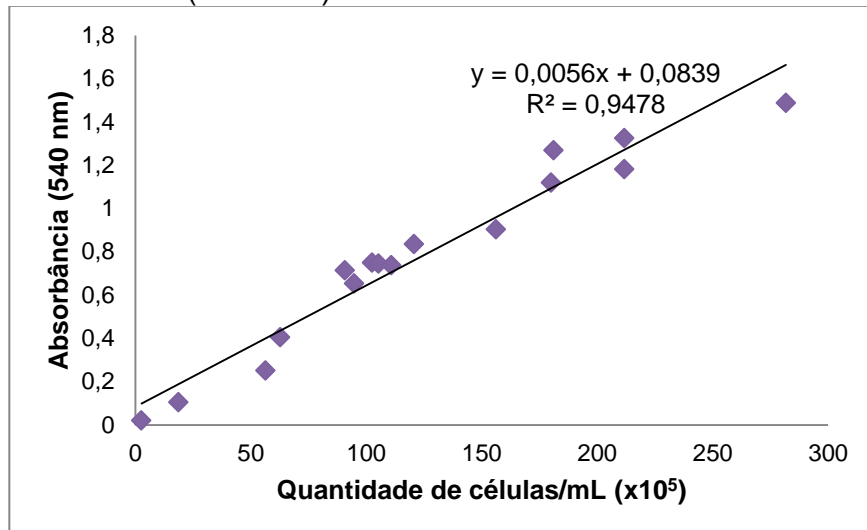
Figura 8 – Sedimentação de biomassa de *Scenedesmus sp.* nas paredes internas do erlenmeyer, em decorrência do processo de autoflocação



Fonte: Autor

A equação da reta de regressão entre as densidades ópticas das culturas e as densidades celulares de *Scenedesmus sp.* (Figura 9) neste cultivo mostra que houve um grau de correlação entre as duas variáveis estudadas, pois a regressão estava em torno de 0,9478.

Figura 9 – Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* em meio NPK (16:08:32).



Fonte: Autor

Na Tabela 7 encontram-se resumidos os dados de outros parâmetros avaliados. As maiores taxas de crescimento (r) ocorrem nos primeiros 2 intervalos. Após isso, as taxas permanecem em valores mais ou menos estáveis, fato também observado por Baumgartner (2014) em seu trabalho utilizando meio NPK (20:5:10).

As divisões binárias também diminuem após o terceiro dia, enquanto se observa um aumento do tempo necessário para a duplicação da população.

Tabela 7 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* cultivadas em meio definido NPK (16:08:32), e nas equações 1 a 3.

Dias	1-2	2-3	3-4	4-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-14	14 -15
N_2/N_1	7,01	3,02	1,11	1,51	0,96	1,13	1,02	1,05	1,09	1,29
$\ln N_2/N_1$	1,95	1,11	0,11	0,41	-0,04	0,12	0,02	0,05	0,09	0,25
$\log_2(N_2/N_1)$	2,81	1,59	0,15	0,59	-0,06	0,18	0,03	0,07	0,12	0,37
Δt (dias)	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1
R	1,95	1,11	0,11	0,14	-0,04	0,12	0,02	0,05	0,03	0,25
K	2,81	1,6	0,16	0,2	-0,06	0,18	0,03	0,07	0,04	0,37
T_2	0,35	0,62	6,3	4,95	-17,32	5,77	34,73	13,86	23,1	2,77

r – taxa de crescimento; k – número de divisões por dia; T_2 – tempo de duplicação da população

Fonte: Autor

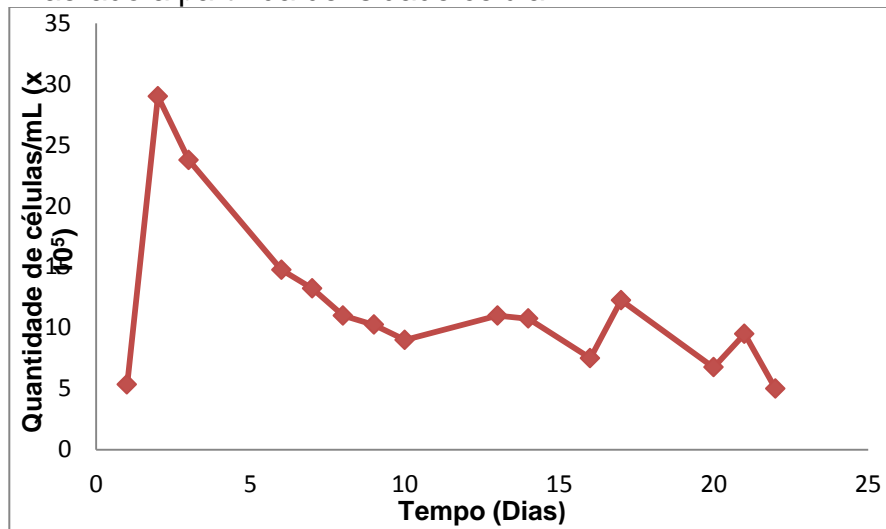
5.3 Crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em meio definido NPK (19:19:19) com aeração

As Figuras 10 e 11 mostram, respectivamente, a variação da densidade celular e da densidade óptica em função do tempo (dias).

Observa-se que o pico de crescimento (5º dia) desta cultura foi bem inferior ao registrado nas curvas do meio WC e NPK (16:08:32). Isso indica baixa adaptação ao referido meio. A partir do segundo dia nota-se uma queda acentuada da quantidade de células.

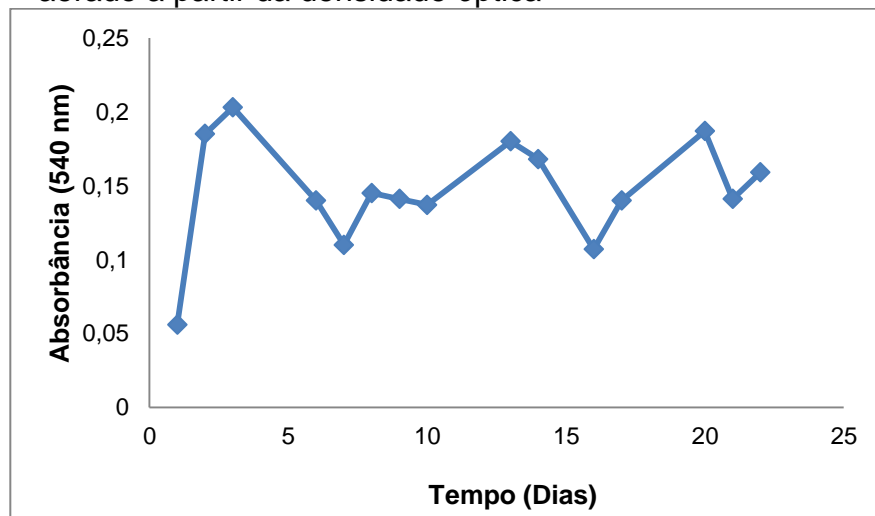
Nota-se também que o pico de densidade celular, no segundo dia, não corresponde ao pico de absorvância, que ocorre terceiro dia. Isso deve-se ao processo de autofloculação da alga, que ocorreu precocemente nesse cultivo, e interferiu na leitura do terceiro dia. O gráfico de regressão linear para este cultivo (Figura 12) também demonstra isso, um vez que o valor de regressão ficou apenas em 0,2572, muito baixo comparado aos cultivos anteriores.

Figura 10 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio NPK definido (19:19:19) aerado a partir da densidade celular



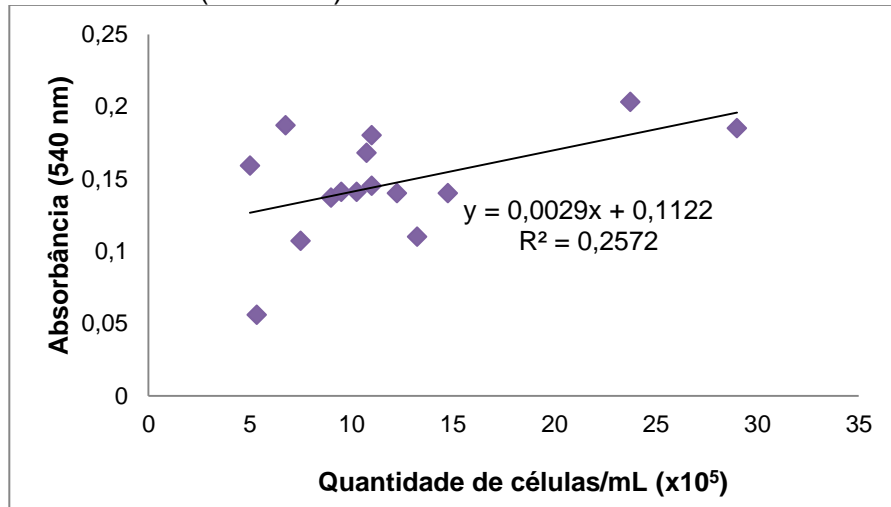
Fonte: Autor

Figura 11 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio NPK definido (19:19:19) aerado a partir da densidade óptica



Fonte: Autor

Figura 12 – Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* em meio NPK (19:19:19).



Fonte: Autor

Uma explicação para isso é a floculação precoce neste cultivo, que tem início já a partir de 3º dia, prejudicando a leitura precisa das absorbâncias.

Na Tabela 8, são avaliados outros parâmetros desse cultivo. A taxa de crescimento só é considerada significativa no primeiro intervalo. A partir de então, verifica-se valores negativos, indicando a ausência de multiplicação.

Tabela 8 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* cultivadas em meio definido NPK (19:19:19), e nas equações 1 a 3.

Dias	1 -2	2-3	3-6	6-7	7-8	8-9	9 -10	10-13	13-14	14-16
N_2/N_1	5,44	0,82	0,62	0,89	0,83	0,93	0,87	1,22	0,98	0,7
$\ln N_2/N_1$	1,69	-0,2	-0,47	-0,11	-0,18	-0,07	-0,13	0,2	-0,02	-0,36
$\log_2(N_2/N_1)$	2,44	-0,29	-0,69	-0,17	-0,27	-0,1	-0,2	0,29	-0,03	-0,51
Δt (dias)	1	1	3	3	1	1	1	3	1	2
R	1,69	-0,2	-0,15	-0,11	-0,18	-0,07	-0,13	0,07	-0,02	-0,18
K	2,43	-0,29	-0,23	-0,16	-0,27	-0,1	-0,19	0,1	-0,03	-0,25
T_2	0,41	-3,46	-4,62	-6,3	-3,85	-9,9	-5,33	9,9	-34,65	-3,85

r – taxa de crescimento; k – número de divisões por dia; T_2 – tempo de duplicação da população

Fonte: Autor

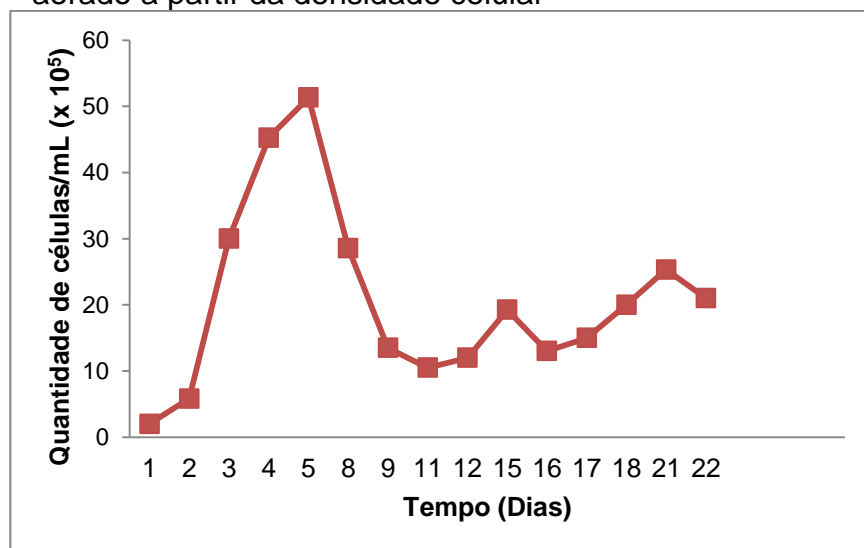
5.4 Crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em meio definido NPK (12:43:12) com aeração

Por fim, observa-se nas Figuras 13 e 14a curva de crescimento da microalga *Scenedesmus sp.*, cultivada em meio NPK nas concentrações massais (12:43:12), utilizando dados de densidade celular e densidade óptica, respectivamente, em sistema de bancada.

É possível observar as fases de indução do crescimento, entre o primeiro e o segundo dia (Figuras 13 e 14). A partir de então, observa-se um rápido crescimento até o quinto dia. A partir de então a cultura entra em declínio. Tanto o pico de absorvância quanto o pico de densidade celular ocorrem no quinto dia de cultivo. A partir de então, a curva entra em declínio, até estabilizar-se em valores bem abaixo do pico.

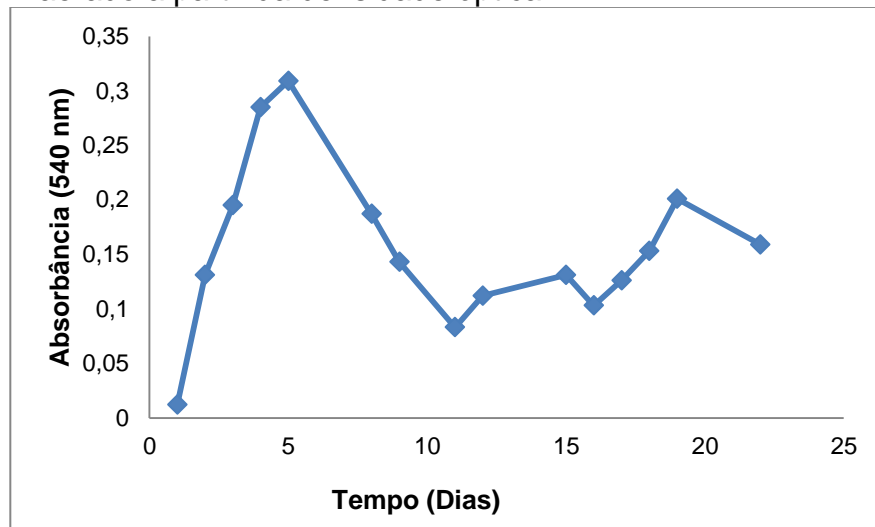
Em relação a equação da reta de regressão entre as densidades ópticas das culturas e as densidades celulares de *Scenedesmus sp.* (Figura 15), houve um grau de correlação entre os dois parâmetros avaliados, uma vez que a regressão estava em torno de 0,9094, embora mais baixos que os cultivos em meios WC e NPK (16:08:32).

Figura 13 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio NPK definido (12:43:12) aerado a partir da densidade celular



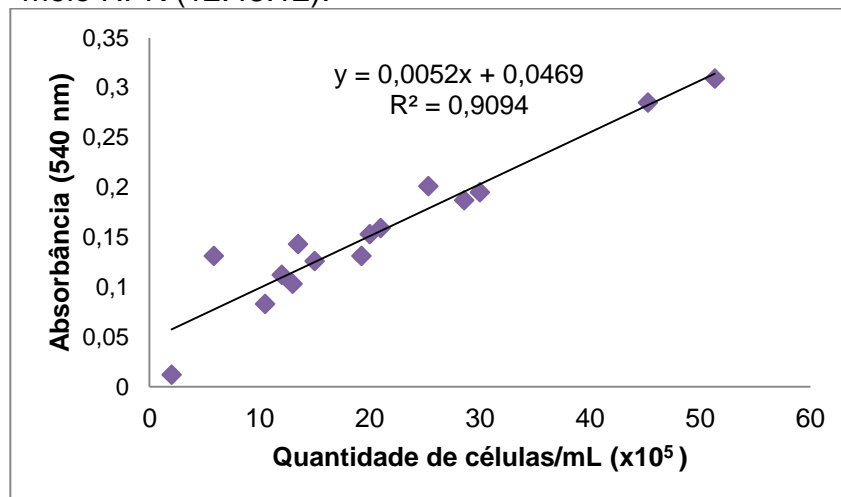
Fonte: Autor

Figura 14 – Curva de crescimento de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio NPK definido (12:43:12) aerado a partir da densidade óptica



Fonte: Autor

Figura 15 – Reta de regressão entre a densidade óptica a densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* em meio NPK (12:43:12).



Fonte: Autor

Na Tabela 9, estão outros parâmetros desse crescimento. Nos quatro primeiros intervalos de tempo, observa-se uma elevada taxa de crescimento e um alto número de duplicações por dia. Após o quinto dia, é observada a queda acentuada desses valores

Tabela 9 – Parâmetros de crescimento calculados com base nas medidas de densidade celular da microalga *Scenedesmus sp.* cultivadas em meio definido NPK (12:43:12), e nas equações 1 a 3.

Dias	1-2	2-3	3-4	4-5	5-8	8-9	9-11	11-12	12-15	15-16
N_2/N_1	2,92	5,15	1,51	1,13	0,56	0,47	0,78	1,14	1,6	0,67
$\ln N_2/N_1$	1,06	1,64	0,41	-0,59	-0,59	-0,75	-0,25	0,13	0,47	-0,39
$\log_2(N_2/N_1)$	1,55	2,36	0,59	0,18	-0,84	-1,09	-0,36	0,19	0,68	-0,58
Δt (dias)	1	1	1	1	3	1	2	1	2	1
R	1,06	1,64	0,41	0,13	-0,19	-0,74	-0,13	0,13	0,24	-0,39
K	1,54	2,36	0,59	0,18	-0,28	-1,08	-0,18	0,18	0,34	-0,57
T_2	0,65	0,42	1,69	5,33	-2,47	-0,94	-5,33	5,33	2,89	-1,78

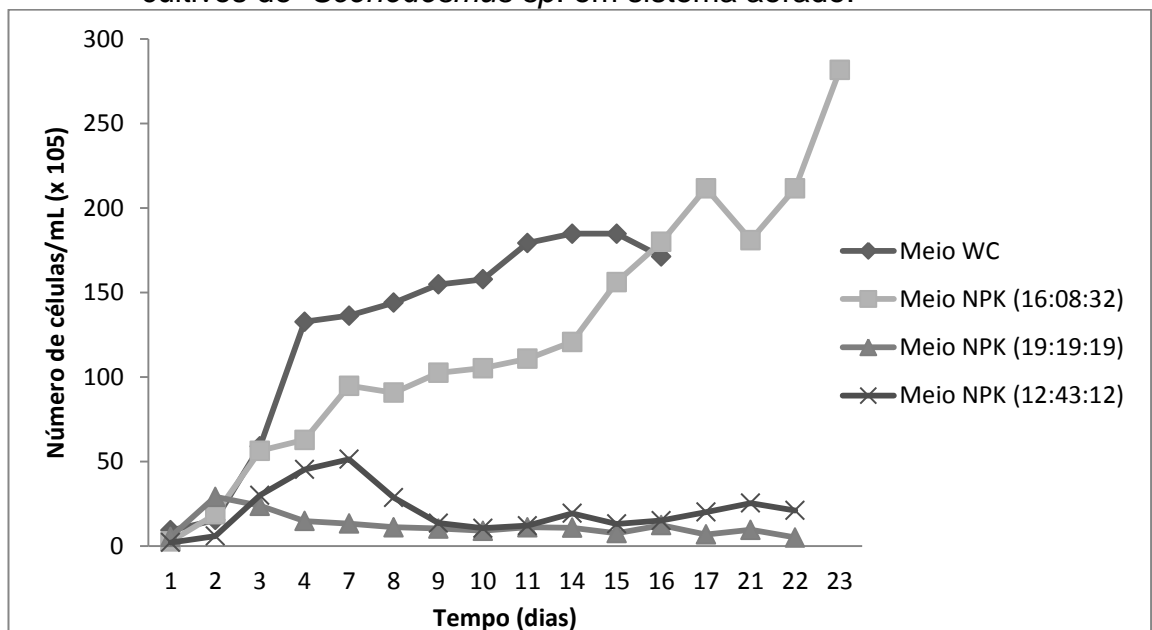
r – taxa de crescimento; k – número de divisões por dia; T_2 – tempo de duplicação da população

Fonte: Autor

5.5 Comparação entre os meios de cultura

As Figuras 16 e 17 apresentam a comparação entre os densidades celulares ópticas (respectivamente) obtidas pelos 4 cultivos em função do tempo.

Figura 16 – Densidades celulares obtida pelos quatro cultivos de *Scenedesmus sp.* em sistema aerado.

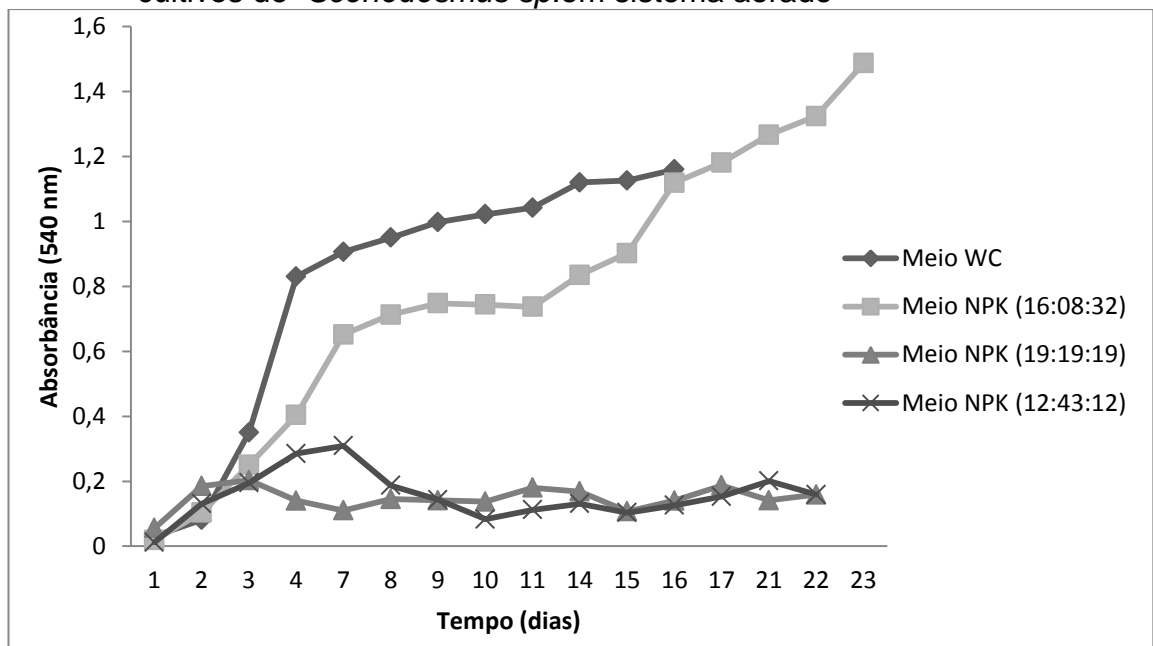


Fonte: Autor

Os meios de WC e NPK (16:08:32) demonstraram serem as melhores opções dentre os 4 testados, tendo apresentando crescimento superior inclusive a outros meios disponíveis no mercado, como o meio CHU, testado por Mariano (2013). Também obtiveram maior crescimento que em meio NPK (20:5:20) (HARDY, 2000).

Nota-se ainda que nos cultivos com meios WC e NPK (16:08:32) não é possível observar com clareza a fases de declínio e morte, devido a interrupção do cultivo. Apenas as fases de indução (ou lag) e a fase exponencial (log) do desenvolvimento microalgal são claras. A fase de declínio já é bem evidente nos outros cultivos testados: NPK (19:19:19) e NPK (12:43:12).

Figura 17 – Densidades ópticas obtida pelos quatro cultivos de *Scenedesmus sp.* em sistema aerado



Fonte: Autor

O baixo crescimento dos cultivos de meios NPK (19:19:19) e NPK (12:43:12) podem ter sido em consequência da baixa concentração de potássio nesses meios em comparação com os outros, uma vez que este macronutriente é indispensável a regulação osmótica, além de ser cofator de várias enzimas e atuar na conformação e estabilidade de muitas proteínas.

Os meios WC e NPK (16:08:32) exibiram maiores valores de absorbância. Com base neste parâmetro, é possível indicar os meios acima citados como melhores opções para o cultivo de *Scenedesmus sp.*

5.6 pH

O meio de cultura, após o seu preparo, teve o seu pH ajustado para 7.0, considerado o pH ótimo de crescimento para a microalga *Scenedesmus sp.* Entretanto, houveram variações no meio ao longo do experimento. A Tabela 10 resume as variações de pH ocorridas.

Tabela 10 – Variação de pH registrado ao longo dos quatro cultivos

Cultivo	pH mais elevado	pH mais baixo	Variação de pH
WC	10.4	6.3	4.1
NPK (16:08:32)	9.0	6.8	2.2
NPK (19:19:19)	7.7	7.2	0.5
NPK (12:43:12)	7.9	7.1	0.8

Fonte: Autor.

Os cultivos em meio WC e NPK (16:08:32) foram os que tiveram maior variação no pH. Um maior pH do meio foi registrado ao 7º dia do cultivo em WC e ao 3º dia do cultivo com meio definido NPK (16:08:32).

Essa alcalinidade elevada do meio corresponde a fase de crescimento exponencial, período de alta frequência de divisões celulares e concentração celular. Isso demanda um maior consumo de CO₂, devido o aumento da atividade fotossintética, o que causa um aumento do pH. (VOLTOLINA; GÓMEZ-VILLA; CORREA, 2005).

Os outros dois cultivos, NPK (19:19:19) e NPK (12:43:12), não tiveram uma variação de pH significativa, refletindo o seu baixo crescimento em comparação aos outros meios investigados.

6 CONCLUSÃO

O meio WC e o meio definido NPK (16.08.32) foram os que atenderam de modo mais adequado às necessidades nutricionais das microalgas, resultando em um maior crescimento das mesmas. Os meios NPK (19:19:19) e (12:43:12) não apresentaram um crescimento satisfatório, e a concentração de nutrientes pode ter sido um fator limitante nestes cultivos.

Os resultados obtidos foram suficientes para apontar um caminho para a obtenção de um melhor rendimento de biomassa microalgal, necessário para futuros estudos acerca do seu teor protéico, importantes para um melhor aproveitamento das aplicabilidades biotecnológicas das microalgas.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J. *et al.* Microalgas: cultivo e aplicaciones. **Monografías n.26**, Universidade da Coruña, España, p.210,1995.
- ABBAS, T.; AHMED BAZMI, A.; WAHEED BHUTTO, A.; ZAHEDI, G. Greener energy: Issues and challenges for Pakistan-geothermal energy prospective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 31, p. 258–269, 2014.
- AGARWAL, A.K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 33, p. 233–271, 2007.
- AMARO, H. M., GUEDES, A., & MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, n. 88(10), p. 3402-3410, 2011.
- ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current opinion in biotechnology**, n. 21 (3) p. 358–364, 2010.
- BAKER, R.; GUNTER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, n.15, p.484-488, 2004.
- BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P.A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 250-255, abr./jun. 2013.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 301, 1994.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition, p. 312– 351. In: Richmond, A. (ed.), **Handbook of microalgal culture**. Blackwell, Oxford , 2004.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições**. São Carlos: RiMa, 2005.
- BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, n.5, p.21-26, 1993.
- BHUTTO. A.W.; BAZMI, A.A.; ZAHEDI, G. Greener energy: issues and challenges for Pakistan-Biomass energy prospective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 15, p. 3207–3219, 2011.
- CAMPO, J.A. *et al.* Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v.76, n.1, p.51-59, 2000.

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

CHIU, S.Y.; KAO, C.Y.; CHEN, C. H.; KUAN, T. C.; ONG, S. C.; LIN, C. S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor **Bioresource Technology**, n. 99, p. 3389–3396, 2008.

CHOCHOIS, V.; DAUVILLEE, D.; BEYLY, A.; TOLLETER, D.; CUINE, S.; TIMPANO, H.; BALL, S.; COURNAC, L.; PELTIER, G. Hydrogen production in chlamydomonas: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. **Plant Physiology**, n. 151, p. 631–640, 2009.

CORNET, JF. Le technoscope: les photobioréacteurs. **Biofutur**, n. 176, p. 1–10, 1998.

CORRÊA, D. O. Cultivo semicontínuo de uma microalga do gênero *Scenedesmus* em fotobiorreator tubular compacto para produção de biodiesel e caracterização do sistema de cultivo. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, 2013.

COURCHESNE, N. M. D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN C. Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, n. 141, p. 31–41, 2009.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 33, p. 1–18, 2007.

DHILLON, R. S.; VON WUEHLISCH, G. Mitigation of global warming through renewable biomass. **Biomass Bioenergy**, n. 48 p. 75–89, 2013.

DOAN, Q.C.; MOHEIMANI, N.R.; MASTRANGELO, A.J.; LEWIS, D.M. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass Bioenergy**, n. 46, p. 79–88. 2012.

DUARTE, I. C. S. Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales). Rio Claro 2001. 148 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

GIDDEY, S.; BADWAL, S. P. S.; KULKARNI, A.; MUNNINGS, C. A comprehensive review of direct carbon fuel cell technology. **Progress in Energy and Combustion Science**, 38 p. 360–399, 2012.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, n.15, p.401-409, 1997.

GUIL-GUERRERO, J. L.; NAVARRO-JUÁREZ, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; CAMPRA-MADRID, P.; REBOLLOSO-FUENTES, M. M. Functional properties of the biomass of three microalgal species. **Journal of Food Engineering**, n. 65, p.511–517, 2004.

HARDY, E. R.; CASTRO, J. G. D. Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. **Acta Amazônica**, n. 30.1,p. 39-47, 2000.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Research**, v.25, n.3, p.247-257, 1996.

HO, C. Y.; CHEN, D. J.; LEE, J. S. Chang Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – a review. **Biotechnology Advances**, n. 29, p. 189–198, 2011.

HOEK, C. VAN DEN *et al.* **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge University, p .623, 1995.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.;N AMPOOTHIRI, K. M.; A. PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, n. 102,p. 186–193, 2011.

KNOTHE, G. Biodiesel: current trends and properties. **Topics in Catalysis**, n. 53, p. 714–720, 2010.

KIM, M. *et al.* *In vitro*inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03. **Antiviral research**, n. 93.2, p. 253-259, 2012.

LACAZ-RUIZ, R. Utilização de meios de cultura a base de solução de cinzas, efluente da indústria cítrica e meios de cultura alternativos formulados através de programa específico de computação para cultivo de *Spirulina platensis*(Norst.).Rio Claro, 1996. 133 p. **Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

LI,W; GUO,Y; FU, K. Enclosure experiment for influence on algae growth by shading light.**Procedia Environmental Sciences (Part B)**, n. 10, p. 1823–1828, 2011.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V.; ANDRULEVICIUTE, V. Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**,n. 12, p. 119–130, 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 14(1), p. 217-232, 2010.

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

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 37.1, p. 52-68, 2011.

OGAWA, S. Aiba Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 23, p. 1121–1132, 1981.

OSHE, S.; DERNER, R.B.; OZÓRIO, R.A.; BRAGA, M.V.C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C.; SANTOS, M.E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 2, 2008.

OROSA, M. *et al.* Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, n.12, p.553-556, 1997.

ÖSTILRLIND, S. Inorganic carbon sources of green algae. I. Growth experiments with *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. **Physiologia Plantarum**, n.3, p. 353–360, 1950.

SPOLAORE, P; JOANNIS-CASSAN, C; DURAN, E; ISAMBERT, A. **Commercial applications of microalgae**. J. Biosci. Bioeng., n. 101, p. 87–96, 2006.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, p.635-648, 2004.

RAVEN, J. A. Sensing pH? **Plant, Cell and Environment**, v.13, p.721-729, 1990.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production **Applied Energy**, n. 103, p. 444–467, 2013.

RICHARDSON, Y.; BLIN, J.; JULBE, A. A short overview on purification and conditioning of syngas produced by biomass gasification: catalytic strategies, process intensification and new concepts. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 38, p. 765–781, 2012.

ROBLES MEDINA, A. *et al.* Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v.16, n.13, p.517-580, 1998.

RUYTERS, G. Effects of blue light on enzymes. **BLUE light effects in biological systems**. Berlin, Springer-Verlag, p.283-301, 1984.

SMEETS, E.M.W.; FAAIJ, A.P.C.; LEWANDOWSKI, I.M.; TURKENBURG W.C. A bottom-up assessment and review of global bio-energy potentials to 2050. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 33, p.. 56–106, 2007.

SKULBERG, O.M. Bioactive chemicals in microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.485-512.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, 243, p. 217–224, 2005.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 4316 – 4342, 2012.

TRIPATHI, U. *et al.* Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, n.68, p.197-199, 1999.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and charge in $K_{1/2}$ (CO_2) of photosynthesis in *C. vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p.379-384, 1991.

VAZHAPPILLY, R; CHEN, F. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, n. 75, p. 393–397, 1998.

VOLKMAN, J.K. *et al.* Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.128, p.219-240, 1989.

VOLTOLINA, DOMENICO; GÓMEZ-VILLA, HERLINDA; CORREA, GABRIEL. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. **Bioresource technology**, n. 96.3, p. 359-362, 2005.

WILLIAMS, A.; JONES, J. M.; MA, L.; POURKASHANIAN, M. Pollutants from the combustion of solid biomass fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 38, p.113–137, 2012.

ZHUKOVA, N.V.; AIZDAICHER, N.A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v.39, n.2, p.351-356, 1995.