

Pablo Diego Gressler

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA CULTIVO DE
MICROALGAS E ENSAIO ECOFISIOLÓGICO
PARA APLICAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL**

Tese submetida ao Programa de Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig.

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner.

Florianópolis
2016

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.**

Gressler, Pablo Diego
Desenvolvimento de sistema para cultivo de microalgas e
ensaio ecofisiológico para aplicação em biotecnologia
ambiental / Pablo Diego Gressler ; orientador, Leonardo
Rubi Röriq ; coorientador, Roberto Bianchini Derner. -
Florianópolis, SC, 2016.
155 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. microalgas. 3.
sistemas de cultivo. 4. Drenagem Ácida de Mina. I. Röriq,
Leonardo Rubi. II. Derner, Roberto Bianchini . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Pablo Diego Gressler

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA CULTIVO DE
MICROALGAS E ENSAIO ECOFISIOLÓGICO PARA
APLICAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL**

Esta Tese foi julgada APROVADA para a obtenção do Título de
“Doutor em Biotecnologia e Biociências, Concentração em
Biotecnologia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 01 de Dezembro de 2016.

Prof. Mario Steindel, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.
Orientador
BOT/CCB/UFSC

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Co-Orientador
AQI/CCA/UFSC

Prof. Marcio Rossi, Dr.
MIP-UFSC

Prof^o. Fabio Farias Neves, Dr.
DEP/CERES/UDESC-Laguna/SC

Prof. José Bonomi Barufi, Dr.
BOT-UFSC

Prof. Rosana Schneider, Dra.
Depto. de Química e Física – UNISC/RS

Prof. Jurandir Pereira Filho, Dr.
CTTMar-UNIVALI Itajaí/SC

Dedico este trabalho à minha família, em especial: ao meu avô, Sr. Alvino Gressler (*in memoriam*), incentivador da leitura e do saber ouvir os outros antes de falar; ao meu tio, o Sr. Jaime Gressler, merecedor de todo o sucesso que alcançou; à minha mãe, a “dona Lurdes”, que nunca se omitiu perante as minhas dificuldades ao longo do caminho, exemplo de bom coração, eterna juventude de espírito, fibra, força e fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos os colegas e amigos que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada ao longo de quatro anos, respeitando minhas opiniões e por vezes limitações, mas simultaneamente contribuindo para o meu crescimento pessoal. Aos professores orientadores Leonardo Rubi Rörig e Roberto Bianchini Derner, por acreditarem na proposta, ainda em 2011 antes da seleção deste doutorado. Agradeço por toda a orientação, amizade, suporte financeiro e técnico disponibilizado ao longo do trabalho, assim como pelo aprendizado para a vida, advindo da convivência diária nestes anos de trabalho.

E tenho dito.
Muito obrigado.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

(Antoine de Saint-Exupéry,
29 Jun 1900 † 31 Jul 1944)

RESUMO

Com o surgimento de novas tecnologias no campo interdisciplinar da Biotecnologia, cresce também a utilização das microalgas em diversos setores de interesse econômico e de tecnologia ambiental. O presente trabalho buscou procurar aliar conceitos distintos de formas de cultivo de microalgas em um único sistema (híbrido), para produção de biomassa e abordar o potencial de uma microalga extremófila quanto a sua tolerância a metais pesados. O trabalho foi desenvolvido paralelamente no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA-UFSC) e no Laboratório de Ficologia (LAFIC-UFSC), entre fevereiro de 2013 e maio de 2015. O capítulo 1 tratou da construção de um sistema híbrido para o cultivo e a realização de testes de batelada com a microalga teste *Scenedesmus obliquus* para validação, com quantificação do crescimento, produtividade, perfil da biomassa (teor de óleo, perfil de ácidos graxos, proteínas, teor de luteína e betacaroteno) quanto à presença de CO₂ no cultivo. O volume total de trabalho do sistema foi definido em 180 litros, que circulou por três segmentos: reservatório, sistema de tubos (2m de coluna d'água) e rampa. A rampa foi definida em 5m² de área superficial com lâmina d'água média de 1,5cm de altura. A vazão de trabalho foi de 55,7 L min⁻¹ e velocidade de fluxo de 0,0619 m s⁻¹. O sistema teve o pedido de patente protocolado junto ao INPI (Apêndice 1). A produtividade líquida média de *S. obliquus*, com CO₂, foi de 7,08 g m⁻² dia⁻¹ contra 0,77g m⁻² dia⁻¹ sem o aporte do gás. Foi observado que o cultivo de *S.obliquus* neste sistema necessita de CO₂ mesmo em baixa densidade. O teor de óleo médio nos experimentos com CO₂ foi de cerca de 20%, contra 15,5% nos experimentos sem CO₂. O resultado também indicou uma maior assimilação de carbono na condição com suprimento adicional de CO₂. A diferença marcante no perfil entre os dois tratamentos foi quanto aos ácidos graxos insaturados com 18 carbonos. Na condição sem CO₂ o ácido oleico (C18:1) foi predominante, ao passo que na condição com CO₂, o ácido α -linolênico (C18:2) foi o mais abundante. O capítulo 2 abordou o crescimento de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 em meio com elevadas concentrações de zinco e cádmio (quantificação de biomassa, glutatonas, fitoquelatinas, pigmentos, zinco e cádmio no sobrenadante e alterações da ultraestrutura). A cepa mostrou alto potencial às concentrações testadas. A presença de fitoquelatinas livres foi reduzida significativamente indicando imobilização dos metais na célula, corroborado pela análise ultraestrutural.

Palavras-chave: Microalgas. Biotecnologia. Fitorremediação.

ABSTRACT

With the emergence of new technologies in the interdisciplinary field of biotechnology, the use of microalgae in various sectors of economic interest and environmental technology is also increasing. The present work sought to combine different concepts of microalgae cultivation in a single system (hybrid) for biomass production and to address the potential of an extremophilic microalgae as to its tolerance to heavy metals. In two chapters the work was divided, with the experimental part developed in parallel in the Algae Cultivation Laboratory (LCA-UFSC) and in the Laboratory of Ficology (LAFIC-UFSC) between February 2013 and May 2015. Chapter 1 dealt with the The construction of the hybrid system for the cultivation and performance of batch tests with the *Scenedesmus obliquus* test microalgae, for validation, with quantification of growth, productivity, biomass profile (oil content, fatty acids profile, proteins, lutein content and betacarotene) for the presence of CO₂ in the culture. The total work volume of the system was set at 180 liters, which circulated through three main segments: reservoir, pipe system (2m of water column) and ramp. The ramp was defined in 5m² of surface area with an average water depth of 1.5cm in height. The workflow was 55.7 L min⁻¹ and flow velocity of 0.0619 m s⁻¹. The system had the patent application filed with the INPI. The average net productivity of *S. obliquus* with CO₂ was 7.08 g m⁻² day⁻¹ versus 0.77 g m⁻² day⁻¹ without the gas carrying. It was observed that the cultivation of *S. obliquus* in this system requires CO₂ even at low density. The average oil content in the CO₂ experiments was about 20%, against 15.5% in the experiments without CO₂. The result also indicated greater carbon uptake in the condition with additional CO₂ supply. The marked difference in the profile between the two treatments was for the unsaturated fatty acids with 18 carbons. In the condition without CO₂ the oleic acid (C18:1) was predominant, whereas in the CO₂ condition, α -linolenic acid (C18:2) was the most abundant. The chapter two were about *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004, were grown in medium with high concentrations of zinc and cadmium (quantification of biomass, glutathione, phytochelatins, pigments, zinc and cadmium in the supernatant and ultrastructure changes). The strain was tolerant to the concentrations tested. The presence of free phytochelatins was significantly reduced indicating immobilization of the metals in the cell, corroborated by the ultrastructural analysis.

Keywords: Microalgae. Biotechnology. Fitorremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do betacaroteno (β -Caroteno) e da Luteína,	28
Figura 2 – Modelo de fotobiorreator do tipo flat panel.....	31
Figura 3 - Fotobiorreator tubular inclinado.....	32
Figura 4 - Representação esquemática do princípio de funcionamento de um fotobiorreator do tipo airlift de loop interno.	33
Figura 5 - Exemplo de fotobiorreator do tipo Biocoil.....	34
Figura 6 - Tanques circulares com um braço mecânico central rotativo.....	35
Figura 7 - Tanques do tipo Raceway.....	36
Figura 8 - Exemplo de sistema de cultivo do tipo TLC	38
Figura 9 - <i>Scenedesmus obliquus</i>	42
Figura 10 - Bacia Carbonífera do Estado de Santa Catarina.....	45
Figura 11 - Drenagem Ácida de Minas de Carvão (DAM).....	47
Figura 12 – Fórmula estrutural da unidade básica das fitoquelatinas.	49
Figura 13 - <i>Chlamydomonas acidophila</i>	51
Figura 14 – Versão definitiva do HAPS.	57
Figura 15 – Dispositivo HOBO® Pendant Data Logger.....	60
Figura 16 - Analisador elementar CHNS/O.....	63
Figura 17 – Extratos lipídicos antes da derivatização dos ácidos graxos da biomassa de <i>S. obliquus</i>	64
Figura 18 – Derivatização do óleo de <i>S.obliquus</i> . 66	
Figura 19 - Esq.: Cromatografo Shimadzu QP 2010 Plus com Injetor Automático AOC 20i acoplado a Espectrômetro de Massas	67
Figura 20 – Determinação do conteúdo proteico por método indireto (Nitrogênio Total Kjeldahl).	69
Figura 21 - Comportamento do pH ao longo do período experimental. 74	
Figura 22 - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e irradiância ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).....	77
Figura 23 - Comportamento do carbono orgânico total (COT – mg L^{-1}).	79
Figura 24 - Densidade celular (A) e biomassa (B) verificadas nos cultivos de <i>S. obliquus</i>	80
Figura 25 – Conteúdo elementar (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio) da biomassa seca de <i>S. obliquus</i>	86
Figura 26 - Valores médios (%) de Carbono e Nitrogênio na biomassa de <i>S. obliquus</i>	86
Figura 27 - Fluorescência da clorofila-a de <i>S. obliquus</i>	87
Figura 28 - Teor de lipídeos na biomassa seca de <i>S. obliquus</i>	88
Figura 29 - Perfil de ácidos graxos predominantes no extrato de lipídios totais da biomassa de <i>S. obliquus</i>	90

Figura 30 - Teor de proteínas na biomassa de <i>S. obliquus</i>	91
Figura 31 - Conteúdo de luteína e betacaroteno na biomassa de <i>S.obliquus</i>	93
Figura 32 - Agitador orbital	99
Figura 33 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Espectrômetro de Massas (HPLC-MS/MS microOTOF-QII).....	101
Figura 34 - Espectrômetro de Absorção Atômica (EAA).....	103
Figura 35 - Absorção Atômica (EAA) com Forno de Grafite (EAA-FG)	104
Figura 36 - Densidade celular inicial e final de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004, em duas concentrações de cádmio.....	107
Figura 37 - Concentração de cádmio no sobrenadante do cultivo de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004.....	109
Figura 38- Concentrações de pigmentos fotossintetizantes (clorofila-s, clorofila-b e carotenoides) de <i>C.acidophila</i> – LAFIC-004 nos tratamentos com zinco.....	111
Figura 39 - Concentrações de pigmentos fotossintetizantes (clorofila-s, clorofila-b e carotenoides) de <i>C.acidophila</i> – LAFIC-004 nos tratamentos com cádmio.....	112
Figura 40 - Médias de glutationas reduzidas (GSH) e fitoquelatinas (FQ4) de <i>C.acidophila</i> LAFIC-004 entre os tratamentos com zinco.	114
Figura 41 - Médias de glutationas reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG) de <i>C.acidophila</i> LAFIC-004 entre os tratamentos com cádmio..	116
Figura 42 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de <i>C.acidophila</i> LAFIC-004	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características comparativas na concepção de fotobioreatores abertos e fechados.	37
Tabela 2 - Período de realização dos diferentes experimentos em batelada no sistema de cultivo.....	59
Tabela 3 – Periodicidade de determinação das variáveis durante os experimentos de cultivo realizados.	61
Tabela 4 - Análise da variância (ANOVA; $p < 0,05$) dos dados quanto ao efeito do tempo e do tratamento (injeção de CO_2) para as variáveis físico-químicas de <i>S. obliquus</i>	73
Tabela 5 - Análise da variância (ANOVA; $p < 0,05$) dos dados quanto ao efeito do tempo e do tratamento (injeção de CO_2) para as variáveis de crescimento de <i>S. obliquus</i>	80
Tabela 6 - Biomassa e produtividade líquida do sistema híbrido nos dois tratamentos testados.	82
Tabela 7 - Dados comparativos de produtividade de microalgas, em especial <i>S. obliquus</i> , em diferentes tipos de fotobiorreatores.....	84
Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos do extrato lipídico de <i>S. obliquus</i>	89
Tabela 9 – Comparação dos valores de proteínas quantificados para <i>S. obliquus</i> em relação a outros trabalhos da literatura.	92
Tabela 10 - Análise elementar e bioquímica de <i>S. obliquus</i> SA1 (dados médios \pm desvio-padrão).	94
Tabela 11 - Desempenho de <i>S. obliquus</i> CNW-N sob diferentes regimes de privação de nitrogênio (N).....	95
Tabela 12 - Tratamentos testados para avaliação da tolerância a metais pesados (cádmio e zinco) com suas respectivas concentrações.....	98
Tabela 13 - Análise da variância (ANOVA fatorial) dos dados de crescimento e pH para <i>C. acidophila</i> LAFIC-004 nos tratamentos com zinco.	106
Tabela 14 - Análise da variância (ANOVA fatorial) dos dados de crescimento e pH para <i>C. acidophila</i> LAFIC-004 nos tratamentos com cádmio.	107
Tabela 15 - Análise da variância (ANOVA fatorial) para as concentrações de metais (zinco e cádmio, inicial e final) no sobrenadante do cultivo de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004.	108
Tabela 16 - Análise da variância (ANOVA fatorial) da concentração de pigmentos fotossintéticos de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004.	110
Tabela 17 – Análise da variância (ANOVA unifatorial) das médias de glutatonas e fitoquelatinas de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004.	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exposição de diferentes microalgas aos metais Zinco e Cádmio...121

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DAS MICROALGAS	25
2.2 O CULTIVO DE MICROALGAS.....	26
2.4 PERFIL BIOQUÍMICO DA BIOMASSA DE MICROALGAS	27
2.4.1 Carotenoides.....	27
2.4.2 Lipídios	28
2.4.3 Proteínas.....	29
2.5 SISTEMAS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS	30
2.5.1 Sistemas fechados	31
2.5.2 Sistemas abertos	35
2.5.3 Sistemas híbridos.....	38
2.6 PRINCIPAIS PARÂMETROS PARA SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS	39
2.6.1 Inclinação	39
2.6.2 Luz.....	39
2.6.3 Temperatura	40
2.6.4 Agitação e fluidodinâmica.....	40
2.6.5 Relação superfície/volume	41
2.6.6 Oxigênio dissolvido e dióxido de carbono	41
2.7 <i>Scenedesmus obliquus</i> (TURPIN) KÜTZING (1833).....	42
2.8 DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO (DAM).....	44
2.9 MICROALGAS E OS METAIS PESADOS DA DAM - ALGUNS ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS.....	47
2.10 METALOTIONEÍNAS	48
2.11 <i>Chlamydomonas acidophila</i> NEGORO (1944).....	50
3. OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 ESTRUTURA GERAL DA TESE.....	53
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, PRODUTIVIDADE E DA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus obliquus</i> SOB A INFLUÊNCIA DE CO₂ EM SISTEMA HÍBRIDO DE CULTIVO	55

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO.....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
CAPÍTULO II – ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE <i>Chlamydomonas acidophila</i> - LAFIC-004 EM CULTIVO COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO E ZINCO.	97
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO.....	97
2. MATERIAIS E MÉTODOS	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
5. CONCLUSÃO GERAL DA TESE	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
7. APÊNDICES	152
7.1 PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, ENTRADA NA FASE NACIONAL DO TRATADO DE COOPERAÇÃO DE PATENTES PROTOCOLADO (INPI - PROCESSO: BR1020160131022).....	152
8. ANEXOS	153
8.1 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NA TESE.....	153

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a ONU, Biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. (Ministério do Meio Ambiente, 1992). Nesse sentido, a Biotecnologia engloba áreas de aplicações biológicas em saúde e biomedicina, na agricultura e na produção de insumos industriais, com uma forte orientação multidisciplinar e experimental. Dentre as disciplinas que constituem as bases da Biotecnologia destacam-se aquelas das áreas biológicas, como a microbiologia e a biologia molecular; das áreas químicas como a química orgânica, analítica e bioquímica e entre as engenharias, tais como a bioquímica ou de bioprocessos e ambiental (UNIFESP, 2015).

Com o crescente surgimento de novas tecnologias no campo interdisciplinar da Biotecnologia, cresce também a utilização de microrganismos como as microalgas em diversos setores produtivos, desde o campo da aquicultura, na alimentação de camarões e peixes, até a industrialização de fármacos e suplementos alimentares para a indústria de alimentação humana (DERNER et al., 2006; DRAAISMA et al., 2013; OSWALD, 1988a) obtenção de biomoléculas com atividades diversas, tais como carotenoides (GUEDES et al., 2011; VARELA et al., 2015) e nutracêuticos (BISHOP e ZUBECK, 2012; VARELA et al., 2015) e cosméticos (WANG et al., 2015). Essa utilização também se aplica no segmento ambiental, em especial na utilização microalgas como bioindicadores ambientais de poluição (LOBO et al., 2004) biorremediação (ADEY et al., 2013; GRESSLER et al., 2014; KANGAS e MULBRY, 2014; PROULX e DELA NOUE, 1988) polimento de efluentes urbanos (CRAGGS et al., 1996; MULBRY et al.; KONDRAD, 2010) com posterior conversão fermentativa da biomassa em geração de biogás (PULZ e SCHEIBENBOGEN, 1998) e de ambientes extremos como a DAM – drenagem ácida de minas de carvão (INTHORN, 2001; KAPLAN, 2004); produção de biocombustíveis (BOZBAS, 2008; CHISTI, 2007; MENEZES, 2015; SCHNEIDER et al., 2012). Ainda, dentre as várias aplicações citadas, há a crescente aplicação das microalgas no campo da nanotecnologia, com diatomáceas sendo empregadas em sistemas ópticos, e em nanolitografia de semicondutores (WANG et al., 2015).

É necessário o desenvolvimento conjunto dos sistemas de cultivo de microalgas, os fotobiorreatores. Em geral, a denominação de fotobiorreator ou PBR (do inglês Photobioreactor) é comumente

utilizada para designar os sistemas tubulares fechados (BOROWITZKA, 1999; TREDICI, 2004), porém, qualquer estrutura que contenha um cultivo de microalgas é um fotobiorreator em potencial, desde um frasco (Erlenmeyer) até um tanque de grande volume a céu aberto. A escolha de qual configuração é preferível, depende da finalidade do objetivo proposto. Estes sistemas ou fotobiorreatores podem ser classificados pelo seu desenho e construção, bem como pelo seu mecanismo de circulação, aeração e interação com seu ambiente (TREDICI, 1999). De acordo com a fonte de luz, podem ser estudados como sistemas dotados de iluminação solar ou artificial (lâmpadas fluorescentes, LED's, etc.) ou, em relação à sua interação com o meio, como sistemas abertos, fechados (controlados) ou mistos (híbridos) que contém ambas as características simultaneamente (CHINI ZITTELLI et al., 2013; RICHMOND, 2004; SUPHI et al., 2006). Dentro desta perspectiva de aproveitamento do potencial biotecnológico das microalgas surgiu esta tese, buscando através de uma abordagem interdisciplinar contribuir ao estudo ecofisiológico de microalgas de interesse econômico, com o desenvolvimento de um sistema de cultivo de microalgas e a bioprospecção de uma cepa extremófila.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DAS MICROALGAS

Basicamente, o termo “microalgas” não tem valor taxonômico, mas é amplamente utilizado para designar um determinado conjunto de indivíduos de complexa origem multifilética e uma grande capacidade de diversificação. Podem ser definidas como organismos fotossintetizantes oxigênicos não enquadrados como plantas terrestres embriófitas. Formam assim, um grupo ecologicamente análogo de organismos definidos por suas origens evolutivas e pelos numerosos tipos de organismos não algais que elas originaram (CAVALIER-SMITH, 2007; DERNER et al., 2006; VAN DEN HOEK et al., 1995).

Apesar de apresentarem uma unidade evolutiva, associada ao aparato fotossintético, suas membranas celulares estão organizadas em três vias profundamente diferentes, refletindo diversos modos de origem. As Proalgas (Cyanobacteria) constituem um filo bacteriano, que evoluiu de bactérias fotossintéticas anoxigênicas mais antigas, há cerca de 3 bilhões de anos atrás. As Eualgas compreendem os grupos eucariontes que divergiram depois que um protozoário biciliado incorporou permanentemente uma cianobactéria para compor o primeiro cloroplasto e o ancestral do reino Plantae, no processo conhecido como endossimbiose primária. Nesse caso, as Glaucophyta divergiram primeiro, depois as algas vermelhas e então as verdes. O outro grupo de algas eucariontes são as Meta-algas, formadas pela incorporação de eualgas por protozoários biciliados hospedeiros que criaram novas membranas genéticas. Incluem algas Cryptista e Chromobiota (reino Chromista) como as Cryptophyta, Heterokontophyta ou Ochrophyta e Haptophyta; e as algas Excavata e Alveolata (reino Protozoa), como as Euglenophyta e Dinophyta. Todas estas surgiram por endossimbiose secundária e terciária pela incorporação de algas vermelhas ou verdes, resultando em uma maior diversificação de plastídeos (CAVALIER-SMITH, 2007).

Organismos derivados das algas incluem muitos protistas não fotossintetizantes (Chromoalveolata, originados de Chromophyta que perderam plastídeos) e plantas terrestres embriófitas (Bryophyta e Tracheophyta) que colonizaram os continentes no período Siluriano, há cerca de 400 milhões de anos atrás (CAVALIER-SMITH, 1998, 2007). Assim, as algas e protozoários protagonizaram a passagem da vida do unicelular ao multicelular, do microscópico ao macroscópico, da

estruturalmente simples forma procarionte aos mais complexos e organizados eucariontes que hoje habitam e moldam a Terra dentro e fora da água.

2.2 O CULTIVO DE MICROALGAS

A coleta de microalgas para utilização na alimentação humana são realizados há séculos (RICHMOND, 1988). Segundo o mesmo autor, povos nativos do Chade, na África, e Astecas do lago Texcoco, no México, alimentavam-se de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* spp. e, ainda hoje, os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, dependem quase que exclusivamente da coleta desta microalga para sua alimentação (DERNER et al., 2006). Várias espécies são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. Segundo PULZ e GROSS (2004), o mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia (BECKER, 2004; DERNER et al., 2006).

Contudo, em termos de sistemas de cultivos massivos (escala piloto), os primeiros registros remontam dos anos 50. Em 1952, o Instituto Carnegie, de Washington nos Estados Unidos, publicou o trabalho intitulado “Algal culture: from laboratory to pilot plant” (BURLEW, 1953), relatando o que havia sido feito em termos de cultivo de microalgas em antes, durante e logo após a segunda guerra mundial. No documento foi apontado o grande e diversificado potencial econômico da aplicação dos cultivos de microalgas, especialmente para suplementação da dieta alimentar de animais e para consumo humano. É desta década o registro das primeiras patentes relativas à exploração de sistemas de cultivo, nos Estados Unidos, como pode ser visto nos documentos depositados pelo Institution of Washington, de 22 de Dezembro de 1950, denominado “Apparatus and process for the production of photosynthetic microorganisms, particularly algae” (Patente US2658310). Nas duas décadas seguintes os trabalhos neste segmento foram continuados por diversos grupos de pesquisa, notadamente nos Estados Unidos, Alemanha, Israel, República Tcheca, Japão, Tailândia e França (CHAUMONT, 1993).

Muitas das substâncias sintetizadas e acumuladas pelas microalgas são também encontradas nas plantas, as quais evoluíram das algas verdes ou clorófitas. Entretanto, segundo COHEN (1986) e RICHMOND (1990), a produção microalgal pode ser justificada por

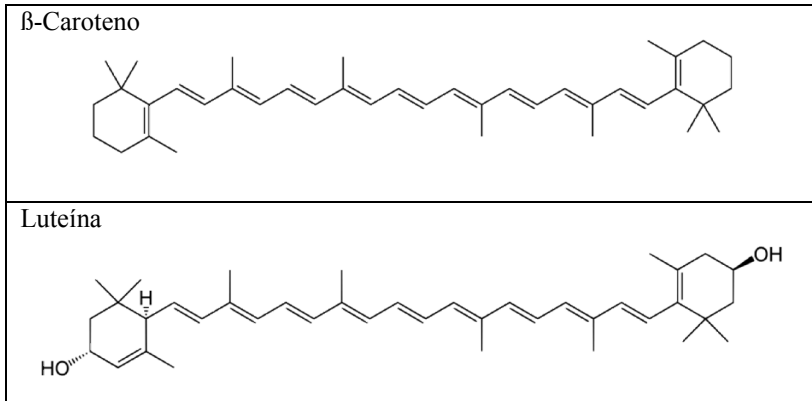
apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas: o cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que, muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos anuais de biomassa (maior produtividade); a natureza unicelular das microalgas assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre com as plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes; por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, por exemplo) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios entre outros compostos (DERNER et al., 2006).

2.4 PERFIL BIOQUÍMICO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

2.4.1 Carotenoides

Os carotenóides são moléculas lipofílicas de estrutura alifática ou alicíclica compostas de oito unidades isoprênicas, onde os grupos metil mais próximos ao centro da molécula estão na posição 1, 5 e os demais grupos metil laterais estão na posição 1, 6 (Figura 1). Os carotenóides podem ser divididos em carotenos, que não apresentam oxigênio na molécula e xantofilas, que são oxigenadas (grupos epoxi, hidroxil, ceto, carboxílico, glicosídico, alênico ou acetilênico) (BECKER, 2004).

Figura 1 - Fórmula estrutural do betacaroteno (β -Caroteno) e da Luteína, pigmentos carotenoides de interesse econômico presentes especialmente nas microalgas verdes.



Fonte: Adaptado de (BEN-AMOTZ, 1999).

Os organismos apresentam uma considerável gama de pigmentos acessórios para otimizar a captura de energia solar. Entre esses pigmentos, alguns apresentam interessantes propriedades nutracêuticas e ainda aplicações como corantes naturais, como é o caso dos carotenoides e das ficobilinas. Dos mais de 600 carotenoides naturais identificados, um número maior que 100 é reportado para microalgas (JEFFREY et al., 1997; LIAAEN-JENSEN, 1978). Carotenoides são componentes importantes de diversos processos biológicos (GRANADO et al., 2003). As quantidades que são encontradas nos tecidos humanos são quase exclusivamente oriundas de dieta de frutas e vegetais ou suplementos (LIMÓN et al., 2015). O quadro 1 apresenta um panorama da distribuição de diferentes pigmentos nos grupos algais.

2.4.2 Lipídios

A produção de microrganismos com potencial oleaginoso tem se mostrado promissora devido ao fato destes organismos apresentarem rápido crescimento e serem fontes de lipídios de interesse comercial (GRESSLER et al., 2014). Microalgas são capazes de transformar fontes de carbono em produtos lipídicos intracelulares (MIAO; WU, 2006), e o conteúdo de lipídios da biomassa pode variar entre 1 a 40%

do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004).

Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono, di, tri ou poli-insaturados (DERNER et al., 2006). Algumas cianobactérias, especialmente as filamentosas, possuem uma quantidade muito grande de ácidos graxos poli-insaturados (20-60% do total). Algumas espécies tem mostrado fotoassimilação anoxigênica de CO₂ com H₂S como doador de elétrons quando necessitam produzir ácidos graxos poli-insaturados. Algas eucarióticas contêm predominantemente ácidos graxos saturados ou monoinsaturados e triglicerídeos como os mais comuns constituintes dos lipídios armazenados, sendo superiores a 80% do total da fração lipídica (BECKER, 2004; OHSE et al., 2007). Em termos de porcentagem, os teores de lipídios totais em massa seca para as classes de algas são: Cyanophyceae, 2-23%; Chrysophyceae, 12-72%; Prymnesiophyceae, 5-48%; Cryptophyceae, 3-17%; Xanthophyceae, 6-16%; Bacillariophyceae, 1-39%; Chlorophyceae, 1-70% e Euglenophyceae, 17% (BOROWITZKA, 1988).

Por diversas razões é crescente o interesse na produção de diferentes culturas como fontes de triglicerídeos para obtenção produtos como o biodiesel, em contrapartida às culturas tradicionais como soja e canola, por exemplo (DISMUKES et al., 2008). Contudo ainda persistem gargalos tecnológicos para que este potencial seja amplamente aproveitado (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011). O equivalente a cerca de 90% da energia envolvida no processo de produção de biodiesel de microalgas, por exemplo, é consumido na etapa de extração do óleo, indicando que avanços nesta etapa tem significativo impacto na economia do processo (LARDON et al., 2009; WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

2.4.3 Proteínas

Microalgas têm um grande potencial como fonte de proteínas para a indústria, uma vez que contêm os aminoácidos essenciais (BARBARINO; LOURENÇO, 2005; BECKER, 2007). Algumas microalgas apresentam conteúdo proteico superior às fontes animais e vegetais comercialmente cultivadas, como é o caso de *Arthrospira platensis*, com 65% mais proteínas do que o leite em pó (36% em média), farinha de soja (37%), frango (24%), peixe (24%), carne de gado (22%) e amendoim (26%) (BARKA; BLECKER, 2016).

Microalgas de água doce, como *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus* spp. também são alvos de interesses econômicos. No primeiro caso, já existe uma ampla aplicação no segmento de suplementos alimentares (ROMERO GARCÍA; ACIÉN FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ SEVILLA, 2012; WANG; ZHANG, 2012). Diversos estudos tem demonstrado que o conteúdo proteico da biomassa microalgal contribui também para a redução da pressão arterial, colesterol de baixa densidade, glicose no sangue, e aumento da imunidade (BARKA; BLECKER, 2016; LISBOA et al., 2014; MIZOGUCHI et al., 2008; VIEGAS et al., 2015).

É crescente também o interesse no estudo e produção de proteínas recombinantes com microalgas (BARKA; BLECKER, 2016; GONG et al., 2011), com aplicações em vacinas, anticorpos terapêuticos e enzimas na indústria de medicamentos. Isto abriu o caminho para a biotecnologia da transformação genética de microalgas. Dada a grande versatilidade metabólica das microalgas e o avanço crescente dos métodos de produção, é provável que muito em breve esta biomassa seja a majoritária matéria prima industrial para a fabricação de muitos compostos de interesse para a saúde humana e animal (BARKA; BLECKER, 2016; RICHMOND; HU, 2013; WANG et al., 2013; WIJFFELS; KRUSE; HELLINGWERF, 2013).

2.5 SISTEMAS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS:

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser classificados pelo seu desenho e construção bem como pelo seu mecanismo de circulação, aeração e interação com seu ambiente. Fotobiorreatores, lato sensu, são reatores nos quais organismos fotoautotróficos (algas, células vegetais e outros microrganismos) são cultivados a partir de uma reação fotobiológica (TREDICI, 1999). De acordo com a fonte de luz podem ser estudados como sistemas com iluminação solar ou artificial (lâmpadas fluorescentes, diodos de emissão de luz-LED etc.) ou, em relação à sua interação com o meio, como sistemas abertos, fechados ou mistos (híbridos), os quais contêm ambas as características simultaneamente (SUPHI e OGUZ, 2006).

Para produtos de alto valor comercial os sistemas fechados são os mais promissores para o desenvolvimento técnico apesar das diversas variações no design (MOLINA GRIMA, 1999; PRUVOST et al., 2016; PULZ, 2001; RICHMOND, 2004; SLEGGERS et al., 2013). A configuração do sistema utilizado, por exemplo os fotobiorreatores fechados, mesmo sendo desfavorável economicamente em um primeiro

momento, pode se tornar eficiente quando considerado o produto de alto valor agregado obtido em quantidades maiores com tempo de produção reduzido (BOROWITZKA, 1994).

2.5.1 Sistemas fechados

Quanto aos fotobiorreatores fechados, basicamente podem ser divididos em: do tipo flat panel, tubular (horizontal, inclinado ou vertical) ou espiral (BioCoil®) (OJAMAE, 2011). O tipo flat panel apresenta ampla área de superfície iluminada, maximizando o aproveitamento da irradiação solar. A Figura 2 ilustra um modelo de flat panel.

Figura 2 – Modelo de fotobiorreator do tipo flat panel.



Fonte: (CAMBIA Co., 2015).

Fotobiorreatores tubulares são sistemas nos quais diversos tubos são conectados em série formando um arranjo vertical ou horizontal. A troca de gases e a adição de nutrientes normalmente é feita em um recipiente anexo a uma das extremidades (RICHMOND, 2004). O controle da temperatura também pode ser feito por borrifamento de água (em sistemas verticais) ou imersão em tanque (para sistemas horizontais). A maioria dos PBR tubulares são geralmente construídos

com vidro ou tubos de polietileno, que consistem em tubos transparentes em linha reta, enrolados ou entrelaçados dispostos em várias formas com uma área de superfície grande para maximizar a captura de luz solar (DORMIDO et al., 2014).

Os fotobiorreatores tubulares verticais podem ser classificados em: coluna de bolhas e do tipo airlift. A coluna de bolhas consiste em um vaso cilíndrico com comprimento, pelo menos duas vezes maior que o diâmetro. Apresenta aquecimento e transferência de massa satisfatórios. A iluminação geralmente é externa e a eficiência fotossintética depende, entre outros fatores, da injeção de gás (CO_2), dos ciclos de luz/escuro e da circulação regular do volume da zona escura central para a extremidade iluminada. Pode ser disposto verticalmente ou inclinado (Figura 3).

Figura 3 - Fotobiorreator tubular inclinado para o cultivo industrial de microalgas.

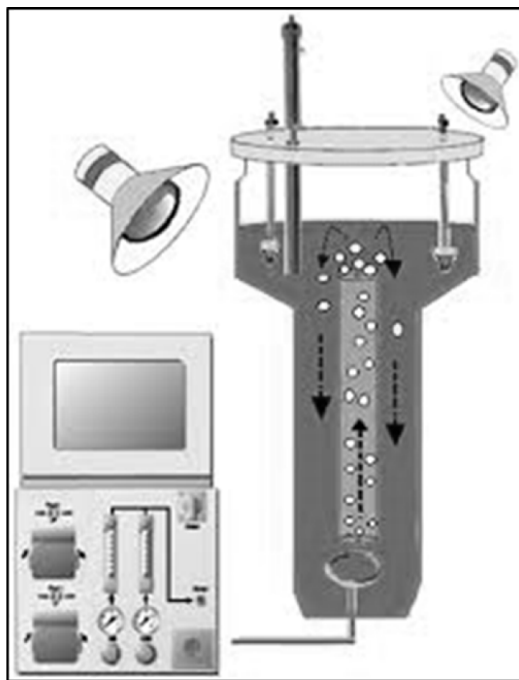


Fonte: GREENFUELS TECHNOLOGY Co.(2007).

O tipo airlift consiste em vasos concêntricos interconectados. Um destes tubos é chamado de riser onde ocorre a troca gasosa. Em geral há dois tipos de airlift, de loop interno e loop externo. No primeiro as regiões internas do tubo são divididas por um cilindro oco por onde o volume circula da base para o topo. No segundo o cilindro concêntrico é

maciço, e o volume circula externamente a este (RICHMOND, 2004; DEMIREL; IMAMOGLU; CONK DALAY, 2015). A agitação se dá por borbulhamento de gás, em especial CO_2 (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática do princípio de funcionamento de um fotobiorreator do tipo airlift de loop interno. Setas pretas indicam o sentido de movimento do volume (cultura) líquido, passando pelo interior do tubo central (em cinza) e retornando à base. Os círculos brancos representam o gás que é injetado na base e é trocado na superfície superior. No tipo loop externo, o tubo central é maciço e a cultura se desloca em torno deste tubo. As variáveis ambientais são controladas por computador.



Fonte: (DEMIREL; IMAMOGLU; CONK DALAY, 2015).

Uma referência que trata minuciosamente a comparação entre fotobiorreatores horizontais versus verticais é o trabalho de Slegers e colaboradores (2013). Neste trabalho foi feito um modelo de simulação vertical e horizontal para quantificar o efeito de variáveis como:

espécies cultivadas, localização, diâmetro dos tubos, concentração de biomassa e distância entre os tubos. O desempenho foi avaliado na Holanda, França e Argélia. Os resultados indicaram que na disposição vertical, a produtividade de biomassa por área é 25-70% maior do que nos sistemas horizontais e o melhoramento da transparência dos tubos (tipo de material constituinte) não afetou significativamente a produtividade por área.

Em outro trabalho, buscando semelhante investigação, Wang e colaboradores (2012) concluem que o design dos fotobiorreatores evolui rapidamente para ir ao encontro das necessidades da produção industrial. Segundo os autores, uma grande variedade de diferentes fotobiorreatores tem sido desenvolvida nas últimas três décadas e os modelos de flat panel bem como os tubulares se mostraram os mais promissores para o segmento industrial.

O sistema em serpentina, chamado Biocoil ou Helical photobioreactor, consiste em tubos dispostos de forma helicoidal, com pequeno diâmetro circundando uma torre (Figura 5). Uma bomba centrífuga é usada para movimentar a cultura ao longo dos tubos até a unidade de troca de gases GEZİCİ e KONURALP (2012).

Figura 5 - Exemplo de fotobiorreator do tipo Biocoil.



]Fonte: GEZİCİ e KONURALP (2012).

2.5.2 Sistemas abertos

Inicialmente denominados de lagoas, estes sistemas constituem as configurações mais antigas conhecidas para a produção de microalgas (PULZ, 2001). Possuem diversas variações, desde uma única unidade ou várias unidades, desde lagoas abertas simples, sem nenhum aparato mecânico para realizar a mistura da cultura, até sistemas mecanizados com agitação produzida por meio de uma roda de pás, hélices ou bombas (CHEN et. al., 2009). Podem ser tanques circulares com um braço mecânico central rotativo para misturar a cultura (Figura 6), ou canais longos numa configuração de circuito único ou múltiplo, agitado por rodas de pás (conhecidos por padle wheel mixed raceway ponds ou raceway pond), atualmente chamados apenas de raceways (CARVALHO et. al., 2006), conforme a Figura 7.

Figura 6 - Tanques circulares com um braço mecânico central rotativo para misturar a cultura.



Fonte: <http://www.sunchlorella.com/>.

Figura 7 - Tanques do tipo Raceway, com agitação promovida por conjunto rotativo de pás, próximas a uma das extremidades dos tanques (no primeiro plano inferior da foto).



Fonte: <http://www.parrynutraceuticals.com/>.

Paralelamente aos PBRs fechados, desde o início dos cultivos massivos, os tanques do tipo raceways e os tanques circulares são ainda os mais utilizados para produção de biomassa microalgal em escala comercial (BOROWITZKA, 1999). Mundialmente, contudo, o sistema adotado para o cultivo em grande escala é o tradicional raceway pond, devido a sua simplicidade e baixo custo operacional, ainda que este sistema conte com consideráveis inconvenientes: alta estratificação térmica entre dia e noite, especialmente em zonas temperadas; baixa relação superfície/volume e com isso menor produtividade volumétrica; baixa densidade celular e com isso redução da eficiência de recuperação da biomassa. Os sistemas fechados podem garantir aumento de produtividade volumétrica e maior qualidade da biomassa, mas isso implica em complexidade técnica, pessoal técnico qualificado e também maior gasto energético para resfriamento das culturas, logo resulta em maior custo operacional (AMOTZ; AVRON, 1989; BOROWITZKA, M.; BOROWITZKA, L., 1987; RICHMOND, 2004; SPOLAORE et al., 2006). A tabela 1 mostra um comparativo geral entre os sistemas abertos e fechados em função de suas características.

Tabela 1- Principais características comparativas na concepção de fotobioreatores abertos e fechados.

Característica	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Espécies de microalgas	poucas possíveis	diversas
Principal critério de seleção de espécies	competição por nutrientes	resistência ao sombreamento
Densidade populacional	baixa	alta
Eficiência de recuperação da biomassa	baixa	alta
Período de cultivo	limitado	estendido
Contaminação	possível	improvável
Perdas de água por evaporação	possível	impedida
Eficiência na utilização de luz	baixa	alta/excelente ^a
Trocas gasosas	pobre	alta
Controle de temperatura	ausente	excelente
Parâmetros de maior custo operacional	agitação	controle de oxigênio e temperatura
Investimento de capital	pequeno	alto

^aVariável em função da transparência do material

Fonte: CARVALHO et al., (2006).

Ainda no segmento de sistemas abertos, porém com uma proposta diferente dos raceways e tanques circulares, existem os sistemas do tipo rampa ou cascata (Figura 8), popularmente conhecidos como “Thin-Layer Cascade systems” (TLC). Esta concepção teve início na década de 70 com o trabalho de SETLIK et al., (1970) e desde então

tem sido aprimorada. Neste tipo de sistema a turbulência é criada por bombeamento e gravidade, onde o cultivo em suspensão escoou como uma fina camada sobre uma rampa. Isto possibilita que a cultura seja desenvolvida em camadas de cultivo muito finas (cerca de 1,0 cm de altura) (DOUCHA e LÍVANSKÝ, 2006; MASOJIDEK et al., 2011; MORALES-AMARAL et al., 2015; OJAMAE, 2011).

Figura 8 - Exemplo de sistema de cultivo do tipo TLC com duas rampas de cultivo, desenvolvido na República Tcheca.



Fonte: <http://www.alga.cz/en>.

2.5.3 Sistemas híbridos

Na década de 1980 Torzillo (1980) e Richmond (1987) chamavam a atenção para esta possibilidade de união de sistemas para o cultivo em grande escala (sistemas híbridos), aliando tanques do tipo raceway e PBR's tubulares, mas só por volta do fim da década seguinte outras alternativas retomaram a ideia, testando outras combinações e mesmo arriscando escala piloto (IDAHO SUSTAINABLE ENERGY, 2013; PUSHPARAJ et al., 1997). Ainda é escassa a literatura sobre estas alternativas de sistemas híbridos com cultivos massivos (grande escala), porém, sua utilização aponta para uma redução dos custos de operação,

como sistemas auxiliares de resfriamento, além de melhor aproveitamento da injeção de gases (CO_2).

2.6 PRINCIPAIS PARÂMETROS PARA SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

2.6.1 Inclinação

Fotobiorreatores fechados e abertos do tipo TLC podem ser inclinados em vários ângulos em relação ao sol, com isso, várias são as possibilidades de irradiância de luz na superfície do reator. Segundo Lee e Low (1991), o ângulo de inclinação não proporciona grande influência quando o cultivo está localizado em região de baixa latitude e o fotobiorreator disposto no sentido leste-oeste. Por outro lado, há um significativo efeito sobre a produtividade em maiores latitudes e sistemas orientados para interceptar a maior radiação solar atingem as maiores produtividades. Sistemas verticais ou dispostos de forma a atenuar a radiação direta proporcionam maiores eficiências na conversão da energia solar.

Em relação aos sistemas inclinados, a agitação exerce papel de grande importância. Isto porque a possibilidade da obtenção de fluxos altamente turbulentos permite a formação de camadas muito finas de cultivo (menos de 1cm) que proporcionam densidades celulares acima de 10g L^{-1} . Além disso, uma alta relação superfície/volume também é obtida ao contrário dos sistemas abertos. Entretanto, estes sistemas são limitados por diversos problemas, entre os quais a sedimentação de células em pontos de baixa turbulência, alta evaporação e volatilização de CO_2 . O conceito de superfície inclinada em sistemas de TLC, patenteado por Doucha e Livansky (1999) tem sido amplamente aplicado e desenvolvido desde 1960 (TREDICI 2004). Fournadzieva e Pillarsky (1993), em uma planta experimental deste tipo instalada em Roupite na Bulgária, com 2.600m^2 , obtiveram produtividades de 18 e 25 $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ cultivando *Arthrospira* e *Scenedesmus* respectivamente.

2.6.2 Luz

A luz como fonte primária de energia para o processo fotossintético é o principal fator limitante nos cultivos autotróficos de microalgas (KIRK, 1994). Em intensidades luminosas acima do ponto de compensação, e de uma fase estacionária, a fotossíntese é diretamente proporcional a esta intensidade luminosa, contudo após um limite

máximo, ocorrem danos ao sistema receptor fotossintético (fotoinibição). Na maioria das espécies de microalgas, a fotossíntese é saturada em torno de 30% da radiação solar terrestre, isto é, entre 1,700-2,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PULZ, 2001).

Em todos os tipos de cultivo, o crescimento é espacialmente confinado pelas dimensões do recipiente de cultivo. Esse confinamento, junto a um determinado aporte de energia solar, leva a uma finita quantidade de energia luminosa que pode ser empregada em um sistema de cultivo. A partir disso, tem se buscado aumentar a eficiência na conversão da luz em biomassa para possibilitar a obtenção de culturas densas que consigam absorver o máximo de luz de forma homogênea (RICHMOND, 2004). O gradiente de luz formado resulta normalmente em uma superexposição da fração superior da cultura e leva à uma baixa eficiência de conversão da luz. Para evitar esta situação, as culturas precisam ser agitadas constantemente (NEDBAL et al., 1996).

2.6.3 Temperatura

A temperatura afeta diretamente o cultivo microalgal, na composição, velocidade metabólica e crescimento celular das microalgas. O crescimento da maioria das microalgas ocorre entre 15-25°C, mas existem espécies euritérmicas que toleram grande variação e apresentam uma temperatura ótima elevada. A máxima produtividade pode ser alcançada apenas se estiver dentro da temperatura ótima para o crescimento, mesmo quando todos os demais parâmetros estiverem de acordo com o exigido para a espécie (TREDICI, 2004).

Enquanto tanques abertos são limitados por baixas temperaturas durante a manhã, fotobiorreatores tubulares necessitam resfriamento especialmente no período de meio-dia. Para contornar a situação, as soluções mais utilizadas incluem: sombreamento; imersão em água; borrifamento de água. Contudo todos estes métodos apresentam limitações, seja operacional refletindo diretamente na produtividade ou econômica (RICHMOND, 2004).

2.6.4 Agitação e fluidodinâmica

A forma adotada para promover a circulação da cultura é um fator determinante na concepção do fotobiorreator. É a agitação que previne o sombreamento da cultura em altas densidades, diminui a estratificação térmica, distribui os nutrientes, auxilia na remoção do oxigênio gerado fotossinteticamente e propicia às células períodos

alternados de luz e escuro necessários a um desenvolvimento adequado (TREDICI, 2004). A fluidodinâmica do meio de cultivo e o tipo de agitação influencia a disponibilidade de irradiação e o regime de luz aos quais as células são submetidas os quais em termos, determinam a produtividade (RICHMOND, 2004).

Via de regra, reatores em serpentina apresentam uma velocidade de 20 a 30 cm s⁻¹. Conforme Molina-Grima (1999), é a velocidade nos tubos que controla a turbulência e a capacidade de transferência de massa, interferindo na concentração de oxigênio e suprimento de dióxido de carbono. São as características do organismo a ser cultivado que determinam a escolha do tipo de agitação. Mesmo a agitação promovida por aeração pode causar stress e danos celulares aos cultivos. Sánchez-Mirón e colaboradores (1999) concluem que coluna de bolhas e sistemas airlift causam menor estresse e por isso são recomendados para organismos frágeis.

2.6.5 Relação superfície/volume

A quantidade de luz que entra no sistema está diretamente relacionada à relação superfície/volume do fotobiorreator. Esta razão entre superfície iluminada e o seu volume influencia a produtividade volumétrica de um cultivo de fotoautotróficos. Em geral, quanto maior a relação, maior a concentração celular que o sistema pode operar e então maior a produtividade volumétrica da cultura, porém até um determinado limite, intrínseco para cada cultivo (TREDICI, 1999).

2.6.6 Oxigênio dissolvido e dióxido de carbono

O acúmulo de oxigênio gerado pela fotossíntese é um fator limitante no escalonamento de fotobiorreatores. A produção deste gás está diretamente correlacionada à produtividade volumétrica, sendo que cultivos em tubos de diâmetro reduzido (1 cm, por exemplo) a concentração pode ser facilmente de superior a saturação do oxigênio dissolvido em relação ao ar (alta relação superfície/volume), algo em torno de 8 a 10 mg O₂ L⁻¹ min⁻¹, tornando-o um gás tóxico ao cultivo pela formação de peróxido, tóxico ao cultivo (WEISSMAN; GOEBEL; BENEMANN, 1988).

O dióxido de carbono (CO₂), é o componente de maior custo para a produção de microalgas, visto ser a fonte de carbono inorgânico preferencial para as mesmas. Entretanto, manter a suplementação de CO₂ sem extrapolar o pH é uma tarefa complexa (RICHMOND, 2004;

TREDICI, 1999). Com a utilização de microbolhas, a eficiência em uma coluna pode ser melhorada em cerca de 70% (MOLINA-GRIMA, 1999).

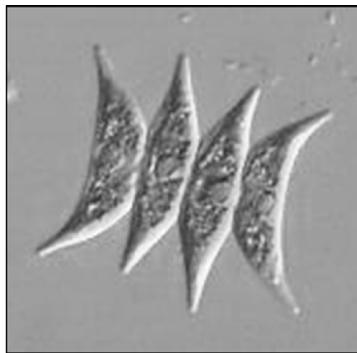
2.7 *Scenedesmus obliquus* (TURPIN) KÜTZING (1833).

Entre as diversas microalgas utilizadas no âmbito da biotecnologia, dentro da divisão Chlorophyta, ou algas verdes, está o táxon *Scenedesmus obliquus*. Tratam-se de indivíduos unicelulares a cenobiais (colônias com número definido de células), podendo formar cenóbios de 2 a 32 células, mas o mais comum são cenóbios de 4 a 8 células, podendo estar circundados por uma matriz mucilaginosa ou não (GUIRY e GUIRY, 2016). A Figura 9 apresenta o fenótipo de *S. obliquus* e sua classificação taxonômica atual, disponível no site AlgaeBase (GUIRY e GUIRY, 2016):

Classificação:

Império: Eukaryota
 Reino: Plantae
 Subreino: Viridiplantae
 Filo: Chlorophyta
 Classe: Chlorophyceae
 Ordem: Sphaeroleales
 Família: Scenedesmaceae
 Subfamília: Scenedesmoidea
 Gênero: *Scenedesmus*
 Espécie: *Scenedesmus obliquus*

Figura 9 - *Scenedesmus obliquus*, cenóbio com 4 células.



Fonte: Algaebase.org.

As células são dispostas linearmente, medindo de 3 a 78 μ m x 2 a 10 μ m (comprimento x largura), com eixos mais longos paralelos entre si. Mais comum é a disposição em linha das células que ora se dispõem, exatamente, uma ao lado da outra numa só série, ora em duas séries graças à alternância das células que se postam, sucessivamente, uma mais para cima e outra mais para baixo. Existem, entretanto, colônias formadas por duas séries superpostas de células que lhes confere a aparência de um disco. As células podem se apresentar iguais no mesmo

cenóbio, ou as extremas serem mais curvadas que as internas. A parede celular normalmente é lisa, porém pode apresentar ornamentações como diminutas verrugas ou crista mediana evidente com uma camada de hemicelulose. A reprodução é assexuada por autósporos, liberados pela ruptura da parede celular. Em casos extremamente raros pode ocorrer reprodução sexuada em *S.obliquus*, com gametas biflagelados (GUIRY e GUIRY, 2016). O cloroplasto é único por célula, localiza-se parietalmente e preenche toda a superfície interna da célula. Há sempre presente um pirenóide próximo ao centro da célula. O gênero *Scenedesmus* está entre os mais comuns e cosmopolitas dentre os gêneros de algas verdes. São indivíduos planctônicos, predominantemente de água doce (raramente em ambiente salobro). Seus indivíduos são comumente encontrados em corpos d'água de todos os graus de trofia, ou seja, oligo, meso e eutrófico. São tipicamente r estrategistas. (BICUDO e MENEZES, 2006; GUIRY e GUIRY, 2016).

Todas as espécies de *Scenedesmus* que possuem espinhos nas células extremas e/ou intermediárias do cenóbio foram recentemente transferidas para o gênero *Desmodesmus*. Tal separação não foi, de fato, apenas morfológica, mas está baseada na comparação da sequência do DNA ribossômico ITS-2. Separar grupos de espécies é uma tentativa, cada dia mais frequente, de melhor organizar os gêneros constituídos por elevado número de espécies e que por isso são, em geral, demasiadamente artificiais e de difícil definição (BICUDO e MENEZES, 2006).

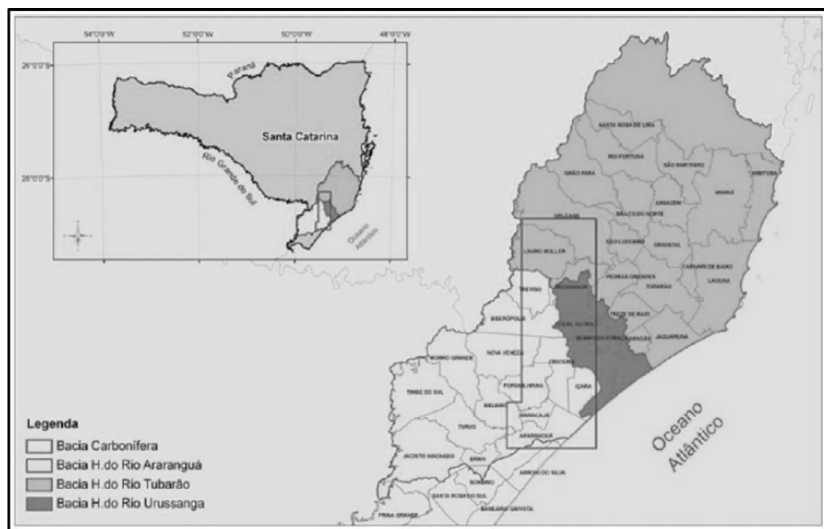
Aparentemente todas as espécies do gênero são fisiológica e bioquimicamente uniformes, produzindo carotenoides secundários especialmente na deficiência de nitrogênio. A temperatura ótima se encontra entre 25-30°C, mas algumas cepas ou espécies apresentam crescimento em 36°C ou acima disso. É comum neste gênero a ocorrência de polimorfismos, sendo que a mudança anatômica é induzida pelas variações das condições ambientais de cultivo. O estudo deste polimorfismo tem sido feito há cerca de cem anos, mas permanece incompleto o seu entendimento. A variação resulta em alteração no número de células por cenóbio, arranjo espacial, tamanho e especialmente expressão das ornamentações das células (espinhos, granulações, cristas). Há registros de mudança nas características ultraestruturais da parede celular de geração para geração com base na nutrição. A produção massiva de *S. obliquus* é feita para suplementação alimentar devido ao seu conteúdo proteico e mineral, aproveitado também na indústria bioquímica (GUIRY e GUIRY, 2016).

2.8 DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO (DAM)

O carvão mineral é um dos combustíveis fósseis mais abundantes do mundo, compreendendo cerca de 27% da matriz energética mundial, perdendo apenas para o petróleo que participa com 33%. Praticamente 90% das reservas mundiais de carvão mineral são encontradas no hemisfério norte, sendo 56,5% na Rússia, 19,5% nos EUA e 9,5% na China, embora esta última seja a maior produtora e consumidora deste minério no mundo, deixando os EUA em segundo lugar, segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica (MENEZES; SANTO; LEAL FILHO, 2002).

No Brasil, o carvão participa com cerca de 5% na matriz energética nacional. Em 2011 o país aumentou as importações em 13,8% e o consumo em 27,3% em relação a 2010, de acordo com dados do Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). O sul do país abriga as principais reservas de carvão, dos 32 bilhões de toneladas a nível nacional, 89,25% deste total situa-se no Rio Grande do Sul (sudoeste do Estado) e 10,41% em Santa Catarina (SILVA, 2011). A maior Bacia Carbonífera do Estado de Santa Catarina está situada no sentido norte/sul, abrangendo os municípios de Araranguá, Criciúma, Forquilha, Siderópolis, Treviso, Urussanga, Içara, Nova Veneza, Morro da Fumaça, Cocal do Sul e Lauro Muller, com 70 km de comprimento por 20 km de largura (AMBONI; ZANUZ; GOMES, 2010). Sua localização afeta as principais bacias hidrográficas do Estado de Santa Catarina, dos rios Araranguá, Tubarão e Urussanga (Figura 10). Geologicamente, corresponde à parte superior da Formação Rio Bonito, mais precisamente o Membro Siderópolis (CAMPOS; ALMEIDA; SOUZA, 2003).

Figura 10 - Bacia Carbonífera do Estado de Santa Catarina (delimitada pelo perímetro em vermelho) dentro das três principais bacias hidrográficas do Estado, dos rios Araranguá, Tubarão e Urussanga.

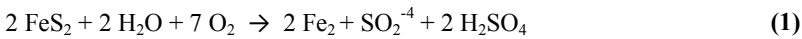


Fonte: Procuradoria da República em Santa Catarina (2014).

Durante este século de exploração de carvão no sul do Estado, ocorreram inúmeros danos ambientais, em especial a contaminação dos recursos hídricos, a destruição de vegetação e a perda de utilidade de extensas áreas (MOURA, 2014). Estima-se hoje que existam aproximadamente 6.400 hectares de áreas terrestres degradadas pela mineração de carvão na região, além de cerca de 800 bocas de minas abandonadas, contribuindo para a degradação das bacias hidrográficas (PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014). A acidificação dos recursos hídricos potencializa o aumento da solubilidade de metais, o que resulta no acúmulo desses elementos muitas vezes tóxicos no ambiente (LEDIN; PEDERSEN, 1996). Como consequência, esses ambientes se tornam inapropriados para a maioria dos seres vivos, sendo habitados principalmente por microrganismos capazes de tolerar a acidez e a alta concentração de metais pesados, os quais podem acumular-se nos organismos causando efeitos adversos e tóxicos nos níveis moleculares e celulares (GEREMIAS et al., 2012).

De acordo com Nascimento e colaboradores (2002) a cada 1000 kg de material minerado, aproximadamente 600 kg é composto por

“rejeitos e estéreis” que são depositados no entorno da área minerada. O principal problema associado a esses materiais é que, normalmente, com o carvão mineral ocorrem também depósitos de pirita e outros minerais sulfetados. De acordo com Mello e Abraão (1998), a pirita (FeS_2) é o principal mineral sulfetado capaz de produzir drenagem ácida de mina. A DAM é formada através de uma sequência de mecanismos de reações de oxidação de sulfetos, catalisados por processos microbiológicos que atuam principalmente quando o pH atinge valores inferiores a 3,5. Os mecanismos de reações podem ser representados pelas equações abaixo (NAJA; VOLESKY, 2011):

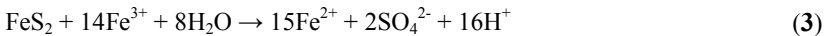


(Oxidação da pirita pelo oxigênio. A pirita (FeS_2) é convertida a sulfato ferroso ($\text{Fe}^{2+}\text{SO}_4^{2-}$) e na medida que se forma, dissocia-se a íon ferroso (Fe^{2+}) e sulfato (SO_4^{2-}).

Em seguida, ocorre a oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}):



Em pH menor do que 3,5 a reação é catalizada pela bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* que pode acelerar a reação em até 10^6 vezes. Então ocorre a oxidação pelo íon férrico:



E finalmente a oxidação do hidróxido de ferro $\text{Fe}(\text{OH})_3$:



Em áreas impactadas por drenagem ácida de mina, que apresentam um pH em torno de 2,5, a elevada concentração de ferro (Fe^{+3}) pode levar à precipitação de hidróxido de ferro $\text{Fe}(\text{OH})_3$, formando um manto colorido chamado “yellow boy” (Figura 11). Isso dificulta a passagem da luz solar comprometendo a fotossíntese dos produtores primários da cadeia trófica, alterando o equilíbrio ecológico local (HARDING; BOOTHROYD, 2004; NOVIS; HARDING, 2007). Esta DAM contém inúmeros sólidos em suspensão e um elevado conteúdo de metais dissolvidos, dentre eles, destacam-se o Al, Mn, Zn, Fe, Cu, Cd e Pb (MENEZES; SANTO; LEAL FILHO, 2002),

comprometendo o desenvolvimento das raízes e, por consequência, o crescimento vegetal nessas áreas. Esses elementos tóxicos também podem inibir o desenvolvimento da microbiota edáfica, como fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas dentre outros, causando deficiência de Fósforo (P) e Nitrogênio (N) às plantas nesses ambientes (CAMPOS; ALMEIDA; SOUZA, 2003).

Figura 11 - Drenagem Ácida de Minas de Carvão (DAM). Efluente característico com a elevada concentração de ferro (Fe^{+3}) que pode levar à precipitação de hidróxido de ferro $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Formação do manto colorido chamado “*yellow boy*”, dificultando a passagem de luz solar e por consequência comprometendo a fotossíntese ao nível dos produtores primários da cadeia trófica, alterando o equilíbrio ecológico local.



Fonte: O Autor (2013).

2.9 MICROALGAS E OS METAIS PESADOS DA DAM - ALGUNS ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS

Microorganismos acidofílicos podem ser definidos como aqueles que possuem pH ótimo para crescimento menor ou igual a 3 (JOHNSON, 2009). Dentre eles, encontram-se diferentes espécies de

organismos procarióticos e eucarióticos. Bactérias podem crescer em condições extremamente ácidas e fungos também podem se manter ativos em condições de pH 0. A maior parte dos organismos responsáveis pela produção primária nestes ambientes são microalgas eucarióticas unicelulares e filamentosas (SCHLEPER et al., 1995).

Nos ecossistemas aquáticos, o pH pode ser considerado uma das variáveis ambientais mais importantes, devido à sua influência na comunidade biótica, nos processos biogeoquímicos, na solubilidade dos sais e na especiação geoquímica dos metais, determinando a biodisponibilidade dos mesmos no ambiente (SCHNEIDER, 2006). Em ambientes muito ácidos, todos os organismos precisam lidar com as altas concentrações de H^+ , que podem provocar vários problemas às células (GROSS, 2000). Uma das maiores dificuldades nestes ambientes é manter a alcalinidade do citosol, pois várias enzimas são dependentes do pH. Manter o pH do citosol exige gasto de energia e um custo metabólico para superar o gradiente de prótons, o que pode ocasionar um decréscimo da produtividade fotossintética nos ambientes ácidos (GERLOFF-ELIAS; SPIJKERMAN; SCHUBERT, 2005).

As algas acidofílicas desenvolveram várias estratégias para se proteger da elevada concentração de prótons (estresse oxidativo), como por exemplo: i) Um potencial de membrana positivo e uma carga positiva no exterior da membrana citoplasmática; ii) A impermeabilidade da membrana aos prótons; iii) Bombas de efluxo de prótons e iv) Proteínas de detoxificação intracelular como as metalotioneínas, fitoquelatinas e glutatonas (GROSS, 2000; ROMANO, 2010).

2.10 METALOTIONEÍNAS

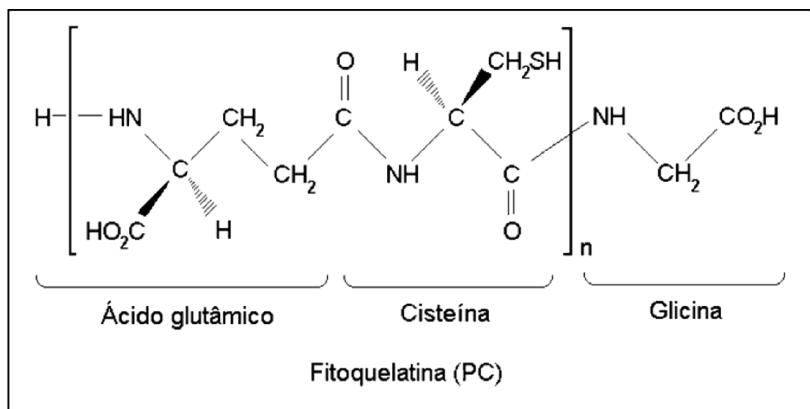
Metalotioneínas e fitoquelatinas estão presentes em todos os organismos vivos, sendo induzidas as suas sínteses, devido à exposição a metais (MELENDEZ et al., 2012). Em 1957 foi publicado o primeiro trabalho ainda na forma de resumo relatando o Cádmio (Cd^{+2}) encontrado em tecido de equino, associado a proteínas (MARGOSHES; VALLEE, 1957). Em 1960 foi publicado o primeiro trabalho completo descrevendo proteínas contendo Cd^{+2} , no qual o termo metalotioneína (MT) foi sugerido para descrever estas proteínas com capacidade para ligar-se a metais (KAGI; VALEE, 1960). A capacidade de peptídeos de ligar-se a metais foi descrita pela primeira vez em 1981. Nesse caso, foi determinado o Cd^{+2} associado a peptídeos em amostras de plantas e

estes peptídeos foram denominados de fitoquelatinas (MURASUGI; WADA; HAYASHI, 1981).

As MT constituem uma superfamília de metaloproteínas ricas em cisteína e metalopeptídeos com baixo peso molecular. Elas são responsáveis pela regulação intracelular, suprimindo a demanda biológica de elementos essenciais como zinco e cobre, e protegendo as células de efeitos deletérios por exposição a elevadas quantidades desses elementos e de metais não essenciais como cádmio, mercúrio etc. São encontradas em todos os filos animais, algumas plantas, fungos e cianobactérias. (MELENDEZ et al., 2012).

Enquanto isso, as fitoquelatinas (Phytochelatinas - PCs) são pequenos peptídeos (2 a 10 kDa) ricos em cisteína, que, normalmente, contém somente três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina (Figura 12). Contudo, outros aminoácidos podem excepcionalmente estar presentes. A estrutura geral das fitoquelatinas é: (γ -glutamil-cisteína) n glicina ($n = 2-11$) e são encontradas em algas, plantas, fungos e alguns nematóides (INOUE, 2005).

Figura 12 – Fórmula estrutural da unidade básica das fitoquelatinas.



Fonte: (MELENDEZ et al., 2012).

A produção de fitoquelatinas e metalotioneínas ocorre com a finalidade de proteger o organismo da ação dos metais tóxicos não essenciais, como cádmio e Arsênio, ou metais essenciais em excesso, que se tornam tóxicos, como zinco e cobre. O estudo das metalotioneínas e das fitoquelatinas é de grande importância, tanto no

ponto de vista ambiental, para avaliação da qualidade de ambientes terrestres e aquáticos, tendo em vista que a acumulação de metais pela biota pode ser usada como indicador de poluição ambiental, como no ponto de vista tecnológico, já que algumas plantas e algas são organismos resistentes que hiper-acumulam metais e podem ser usadas com a finalidade de remediação de áreas contaminadas por metais, como solos e águas (KHAN et al., 2000; MELENDEZ et al., 2012; PERALES-VELA; PEÑA-CASTRO; CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2006).

Uma das vantagens do uso de metalotioneínas e das fitoquelatinas como indicadores é o fato de a produção destas ser um indicador de exposição a metais, respondendo bem antes que seja possível mensurar um efeito fisiológico no organismo como alteração na velocidade de crescimento ou diminuição da capacidade reprodutiva (MONSERRAT et al., 2007). Na área ambiental, uma das grandes aplicações da determinação de fitoquelatinas é a seleção de espécies capazes de hiper-acumular metais para utilização no processo de fitorremediação, que possibilita a descontaminação de ambientes pela sorção de metais pelas plantas. O mesmo vale para processos de ficorremediação, onde microalgas extremófilas podem metabolizar metais pesados presentes em corpos d'água de forma a impedir sua acumulação e mobilidade na cadeia trófica. Estes processos podem ser caracterizados como “limpos”, com a vantagem adicional de alterar muito pouco as propriedades e a estrutura física do ambiente (MELENDEZ et al., 2012; PERALES-VELA; PEÑA-CASTRO; CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2006; SANSAWA; ENDO, 2004).

2.11 *Chlamydomonas acidophila* NEGORO (1944).

Outra espécie que merece atenção no segmento da biotecnologia ambiental é *Chlamydomonas acidophila*, uma microalga que vive em ambientes como a DAM. É uma espécie extremófila, para ambientes de grande acidez e concentração de metais em suspensão (NISHIKAWA e TOMINAGA, 2001). Morfologicamente se apresenta como indivíduos de talo unicelular, tipicamente esférico tendendo a fusiforme. Cada célula tem tipicamente dois vacúolos contráteis anteriores, porém os mesmos podem estar em maior número ou mesmo ausentes (dependendo da variedade da espécie e condição ambiental de cultivo). Apresenta também dois flagelos na região anterior, um cloroplasto simples por célula e extremamente variável dentro do gênero, usado como base para diferenciação de grupos de espécies. Um

pirenóide (podendo apresentar mais de um) de posição variável. Possui estrutura fotossensível, o estigma ou ocelo (eyespot), na região anterior envolto pelo cloroplasto. Núcleo simples e tipicamente central, em média $< 5 \mu\text{m}$ (GUIRY e GUIRY, 2016).

A reprodução no gênero pode ser assexuada com formação de zoósporos onde as células filhas produzem enzimas que rompem a parede da célula mãe para ocorrer a liberação. Pode também ser sexuada, com formação de gametas (as condições ambientais são determinantes para o desencadeamento do tipo de reprodução) (GUIRY e GUIRY, 2016). A Figura 13 apresenta o fenótipo de *C. acidophila* e sua classificação taxonômica atual, disponível no site AlgaeBase (GUIRY e GUIRY, 2016):

Classificação:

Império: Eukaryota
 Reino: Plantae
 Subreino: Viridiplantae
 Filo: Chlorophyta
 Subfilo: Chlorophytina
 Classe: Chlorophyceae
 Ordem: Chlamydomonadales
 Família: Chlamydomonadaceae
 Gênero: *Chlamydomonas*
 Espécie: *Chlamydomonas acidophila*

Figura 13 - *Chlamydomonas acidophila*



Fonte:
<http://botany.natur.cuni.cz>.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir e testar um sistema de cultivo híbrido de microalgas e realizar a bioprospecção de uma cepa de microalga extremófila para metais presentes em ambientes impactados por DAM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram desenvolvidos ao longo dos capítulos a seguir, dentro da estrutura geral da tese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRUTURA GERAL DA TESE

Para melhor compreensão do desenvolvimento geral da tese, o mesmo foi estruturado em dois capítulos, conforme a seguir:

CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, PRODUTIVIDADE E DA BIOMASSA DE *Scenedesmus obliquus* SOB A INFLUÊNCIA DE CO₂ EM SISTEMA HÍBRIDO DE CULTIVO.

CAPÍTULO II – ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 EM CULTIVO COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO E ZINCO.

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, PRODUTIVIDADE E DA BIOMASSA DE *Scenedesmus obliquus* SOB A INFLUÊNCIA DE CO₂ EM SISTEMA HÍBRIDO DE CULTIVO

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo são apresentados os resultados relativos aos objetivos específicos da tese referentes ao desenvolvimento de sistema para cultivo de microalgas, que foram: a) Construir um sistema híbrido para o cultivo de microalgas unindo características de um sistema aberto do tipo TLC e outro fechado do tipo PBR de coluna de bolhas, em um único sistema; b) Realizar testes de batelada com a microalga teste *S. obliquus* para validação do sistema nas condições de cultivo definidas; c) Analisar o crescimento e a produtividade de *S. obliquus* em relação à presença e ausência de CO₂ suplementar no cultivo; d) Avaliar o perfil da biomassa de *S. obliquus* quanto ao teor de óleo, perfil de ácidos graxos, teor de luteína e β-caroteno. Os resultados obtidos neste capítulo contaram com a colaboração do Laboratório de Instrumentação Analítica da UNISC e do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

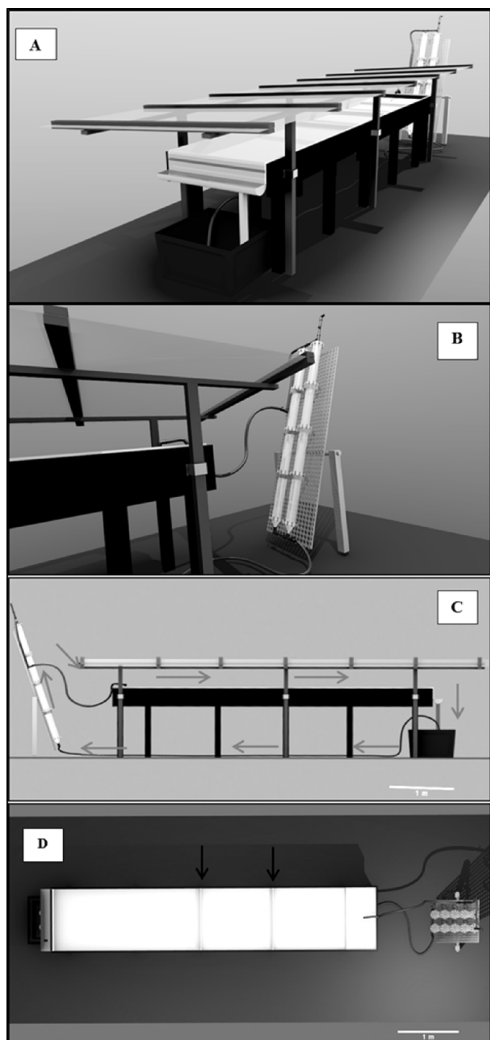
Descrição do Sistema Híbrido de Cultivo (HAPS)

O sistema utilizado nesta tese passou por diversas modificações técnicas e testes de cultivo até a versão definitiva (dados não apresentados). A versão que será apresentada a seguir e visou essencialmente aproveitar a condição de rampa dos sistemas TLC (Thin Layer Cascade Photobioreactors) e a maior superfície de contato entre o CO₂ e as células, típico dos TPBR (Tubular Photobioreactor), enquadrando-se como um sistema híbrido de produção algal, ou HAPS (Hybrid Algae Production System).

O sistema apresenta três partes principais: o reservatório, os tubos e a rampa (Figura 14). O volume total da unidade piloto construída é de 180L. O fluxo começa pelo reservatório onde uma bomba submersa (0.16 HP) recircula a cultura pela parte inferior da rampa através de uma mangueira de 32 mm de diâmetro e 7m de comprimento em direção aos tubos. Um difusor de microbolhas foi acoplado à bomba para possibilitar a injeção de CO₂, o qual pode operar

opcionalmente. A mangueira se conecta aos dois tubos por uma bifurcação. Os tubos são constituídos de acrílico transparente, possuindo 10 cm de diâmetro e 2m de altura. A inclinação dos tubos é ajustável. No topo dos tubos há um degasser, com vazão de gás ajustável através de um registro. O fluxo segue então para a rampa, através de um tubo de PVC que causa um espalhamento do líquido no início da rampa, ajustando o fluxo à uma condição uniforme no percurso da rampa. A rampa é constituída em PVC branco com 1m de largura por 5m de comprimento ($5m^2$) e uma inclinação de 1,5%. Ao longo da rampa foram fixadas 3 comportas equidistantes para aumentar o tempo de detenção hidráulica e homogeneizar a espessura da coluna de água, aumentando o tempo de exposição à luz solar. Essas comportas, confeccionadas no mesmo material da rampa, apresentam 3 cm de altura e tem o objetivo de criar um fluxo rápido na parte inferior evitando a sedimentação de células. A lâmina de água na rampa pode ser ajustada entre 0,5 e 3 cm. Ao final da rampa o volume é coletado em uma calha e retorna ao reservatório. Perdas por evaporação foram compensadas com água filtrada livre de cloro, através de uma válvula de nível que regula a compensação. Sobre a rampa e reservatório há uma cobertura de acrílico transparente para evitar a diluição em caso de chuva.

Figura 14 – Versão definitiva do HAPS. (A) Vista geral em perspectiva; (B) Sistema de tubos (C) Vista geral lateral, setas indicam o sentido do fluxo. Inserção do CO₂ não representada; (D) Vista geral superior (sem cobertura)



Fonte: Felipe Neves.

Microalga e condições experimentais de cultivo

Para avaliar o comportamento do sistema, duas condições experimentais foram testadas: (a) sem injeção de CO₂ e (b) com injeção de CO₂. A cepa de microalga utilizada foi *Scenedesmus obliquus*, cosmopolita, naturalmente ocorrente na região e resistente a contaminação por outras algas (fato constatado em trabalhos feitos no LCA-UFSC anteriormente, onde foi isolada e é mantida em coleção de cepas). Para os experimentos foi utilizado um volume de inóculo de 50L de cultura, em média, sempre em fase exponencial de crescimento, contendo em média 3×10^6 células mL⁻¹. Foi utilizado o meio de cultura MC (WATANABE, 1960), modificado pelo LCA-UFSC, sendo composto por: 1,05g L⁻¹ de NaNO₃, 1,25g L⁻¹ de MgSO₄.7 H₂O, 0,658g L⁻¹ de NaH₂PO₄, 0,02g L⁻¹ FeCl₃.6 H₂O e 1,0g L⁻¹ de NaHCO₃. Optou-se por reagentes de grau agrícola de pureza, para testar a produtividade em uma condição de baixo custo de operação. A vazão de operação do sistema em todos os experimentos foi de 55,7 L min⁻¹ com uma velocidade de fluxo na rampa de 0,765 m s⁻¹. A espessura média da lâmina d'água utilizada nos experimentos foi de 1,5cm.

Foram realizadas 3 repetições para a condição sem CO₂ e 3 para a condição com CO₂. Nos experimentos com CO₂ foi utilizado CO₂ industrial, com grau de pureza de 99,8%. O aporte de CO₂ foi realizado em intervalo de 30min com tempo de injeção de 15min, com fornecimento de 1,0 mL min⁻¹, diariamente das 6:00 às 19:00 horas, constituindo o período de luz na região para o período experimental. Testes prévios realizados nas mesmas condições experimentais aqui descritas mostraram que este regime de aporte de CO₂ foi suficiente para manter o pH em torno da neutralidade (pH = 7± 0.3). Os experimentos foram conduzidos em batelada, com duração de sete dias, entre setembro de 2014 e abril de 2015 (Tabela 2). Este período corresponde à primavera e verão nesta região subtropical (Lat. 27,6 S; Long. 48,5 W), sendo caracterizado por temperaturas relativamente elevadas (média diária de 22°C), pluviosidade moderada (precipitação acumulada mensal de 140 mm) e 12 a 13,5 h de luz diária (PANDOLFO et al., 2007).

Tabela 2 - Período de realização dos diferentes experimentos em batelada no sistema de cultivo.

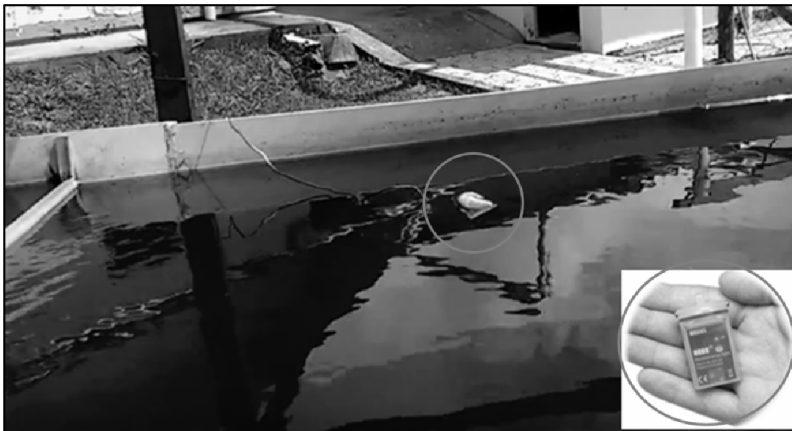
Experimento	Condição	Período de realização
1	s/ CO ₂	07/09/2014 – 15/09/2014
2	s/ CO ₂	29/09/2014 – 06/10/2014
3	s/ CO ₂	17/11/2014 – 25/11/2014
4	c/ CO ₂	26/02/2015 – 06/03/2015
5	c/ CO ₂	13/03/2015 – 21/03/2015
6	c/ CO ₂	16/04/2015 – 24/04/2015

Fonte: o autor.

Variáveis físico-químicas, químicas e ambientais

Durante os experimentos foram monitoradas as variáveis: temperatura do ar (°C), irradiância ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura da água (°C), condutividade (mS cm^{-1}), pH, turbidez (UNT) e carbono orgânico total (COT, mg L^{-1}). Condutividade, pH e turbidez foram determinadas *in situ* através de sondas devidamente calibradas. A temperatura do ar durante os experimentos foi obtida do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET - Brazil) a partir de estação meteorológica situada próxima ao local do sistema experimental. A temperatura do líquido na rampa e a irradiância incidente no sistema de cultivo foram medidos continuamente com registros a cada cinco minutos, ao longo de todos os períodos experimentais, através de um dispositivo HOBO® Pendant Data Logger modelo UA-002-64 (OnSet™), instalado na região central da rampa, sob a lâmina de água (Figura 15). Os dados foram processados com o auxílio do software HOBOWare® Pro, versão 3. O COT foi determinado por combustão catalítica, em um Vario TOC Analyzer (Elementar™), devidamente calibrado. A periodicidade de determinação das variáveis em cada experimento é apresentada na tabela 3.

Figura 15 – Dispositivo HOBO® Pendant Data Logger modelo UA-002-64 (OnSet™), instalado na região central da rampa, sob a lâmina de água.



Fonte: O autor.

Uma vez que os experimentos foram realizados em diferentes períodos e sob diferentes regimes de irradiância, os dados registrados pelo HOBO data logger foram integrados para gerar um somatório da energia luminosa (PAR) incidente no sistema ao longo do tempo de cultivo considerado. Para tanto, primeiramente os valores de irradiância em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram convertidos para Wm^{-2} (Watts por metro quadrado), que é equivalente a $\text{J s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Joules por segundo por metro quadrado). A unidade de energia resultante é J m^{-2} . Uma vez que o sistema tem uma área de 5 m^2 , o valor em J m^{-2} foi multiplicado por 5 para obter a energia total em J e, posteriormente, convertido em Mega Joules (MJ), para diminuir a amplitude dos valores. A integração foi feita diretamente na planilha de dados pelo método trapezoidal conforme Cheney e Kincaid (2013). Os dados de energia assim gerados foram utilizados para calcular a eficiência de utilização de energia pelos cultivos no sistema ao longo dos diferentes experimentos (ver seção Biomassa e Produtividade). Esse parâmetro foi calculado através da equação 6:

$$EEC = \frac{RB_t}{PAR_{int}} \quad (5)$$

Onde:

EEC: Eficiência Energética do Cultivo em mg MJ-1;

Rbt = Rendimento em biomassa estimado para o tempo t em mg* (momento de obtenção da maior quantidade de biomassa menos a biomassa inicial);

PARint = Energia luminosa integrada até o tempo t em MJ.

* A biomassa foi convertida em mg para aumentar a amplitude dos valores de EEC.

Tabela 3 – Periodicidade de determinação das variáveis durante os experimentos de cultivo realizados.

Variável	Periodicidade	
	Experimentos (sem CO ₂)	Experimentos (com CO ₂)
Condutividade	intervalos de 6h	intervalos de 4h
Turbidez	intervalos de 6h	intervalos de 4h
pH	intervalos de 6h	intervalos de 4h
Temperatura do ar	intervalos de 8h	intervalos de 8h
Carbono Orgânico Total	intervalos de 6h	intervalos de 4h
Temperatura da água	intervalos de 5min	intervalos de 5min
Irradiância	intervalos de 5min	intervalos de 5min
Biomassa seca	intervalos de 6h	intervalos de 4h
Concentração de células	intervalos de 6h	intervalos de 4h

Fonte: o autor.

Biomassa e produtividade

A verificação do crescimento de *S. obliquus* foi verificada a partir da determinação da biomassa seca e da concentração de células ao longo do tempo. A biomassa seca (g L⁻¹) foi determinada por gravimetria, a partir de DERNER (2006), onde 50mL da cultura foram

filtrados através de filtros de fibra de vidro (GF-F; 0,22 μ m; 47 mm de diâmetro) pré-secos a 100°C por 60min até peso constante, mantidos por 30 minutos em dessecador e pesados em balança analítica (precisão 0,0001g). Após a filtração os filtros foram secos em estufa a 60°C por 24 horas, mantidos por 30 minutos em dessecador e novamente pesados. A diferença de peso obtida na gravimetria refere-se à biomassa seca de microalgas. Paralelamente, alíquotas de 3 mL das amostras de cultivo eram fixadas com lugol para posterior determinação da concentração de células por mililitro (cel. mL⁻¹) utilizando-se câmaras de Neubauer. A produtividade líquida (P_{net}, g m⁻² dia⁻¹) foi estimada a partir dos dados de incremento de biomassa (g L⁻¹) ao longo do tempo (dias), considerando-se a relação de volume (L) de cultivo e a área (m²) de exposição à luz solar, correspondente à área da rampa. A área de exposição relacionada aos tubos foi desprezada. Para fins de cálculo da produtividade líquida foram considerados os dados de tempo inicial (logo após a inoculação) e o tempo onde foi registrado maior valor de biomassa na batelada. O cálculo da produtividade líquida foi realizado conforme a equação 6:

$$P_{net} = \frac{(X_t - X_0)}{t} \times \frac{V}{A} \quad (6)$$

Onde:

P_{net}: é a produtividade líquida em g m⁻² dia⁻¹;

X₀: é a concentração de biomassa seca no início do ciclo de crescimento;

X_t: é a máxima concentração de biomassa seca registrada após n dias de cultivo;

V: é o volume da suspensão no fotobiorreator em L;

A: é a área da rampa (seção TLC) do sistema em m²;

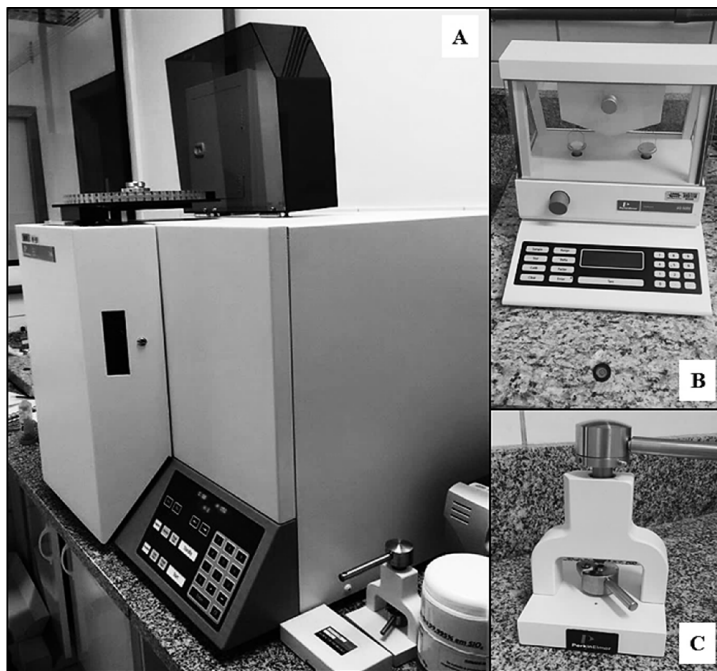
t: é o tempo em dias onde se registrou a máxima biomassa ao longo do ciclo experimental.

Composição elementar da biomassa (CHN)

A biomassa gerada e colhida ao final das bateladas de cultivo do capítulo 2 foi analisada quanto à composição elementar relativa de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN), a fim de verificar se as condições diferentes (sem e com CO₂) determinariam variações nessa composição. Para análise de CHN (previamente seca e liofilizada) foram

tomadas amostras com massa média de 2,5mg, pesadas em balança analítica (Perkin-Elmer, precisão de 10-6g, parte integrante do analisador) e encapsuladas para injeção de sólidos no analisador elementar CHNS/O 2400 série II (Perkin Elmer, Figura 16), conforme instruções do fabricante, no Laboratório de Instrumentação Analítica da UNISC. A técnica utilizada para a determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi de combustão em meio de oxigênio puro e as leituras foram realizadas em triplicata.

Figura 16 - Analisador elementar CHNS/O (modelo 2400 série II - Perkin Elmer) (A). (B): balança analítica com precisão de 10-6g (modelo Autobalance AD6000- Perkin Elmer); (C): Encapsulador utilizado para preparação das amostras para análise elementar (Perkin-Elmer).



Fonte: o autor.

Oleoquímica - teor de óleo e perfil de ácidos graxos de *S. obliquus*

A extração dos lipídios foi realizada a partir do método de Bligh e Dyer (1959) adaptado por (SOARES, 2010), no Laboratório de Instrumentação Analítica da UNISC. Foram pesados 0,2 g de biomassa de *S.obliquus* liofilizada em tubos de ensaio de 12 mL em triplicata. Em seguida, adicionou-se 3 mL de um mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v) e 10 μL de uma solução de butil hidróxi tolueno (BHT). A seguir, as amostras foram submetidas ao ultrassom em um sonicador (USC 700, frequência 55 Hz) em banho de gelo por 3 ciclos de 15 min cada. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 24 h a 4 °C e protegidas da luz (embrulhadas com papel alumínio para prevenir a fotoxidação das amostras) para posterior extração dos lipídios. Após, as amostras foram novamente submetidas por 3 ciclos de 15 minutos cada e centrifugadas por 10 minutos sendo que o sobrenadante foi recuperado com uma pipeta Pasteur e transferido a outro tubo reservado. Foram adicionados 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio ao tubo reservado. As amostras foram novamente centrifugadas; a fase inferior (clorofórmio: lipídio) foi recuperada, com uma pipeta de Pasteur, e transferida para um frasco de vidro pré-pesado. A fase aquosa foi lavada com 1 mL de clorofórmio e centrifugada novamente por 10 min. Então, a fase inferior foi recuperada e transferida para o frasco de vidro seco e pré-pesado. Após este procedimento os frascos contendo o extrato lipídico foram para secagem em estufa a 60 ± 1 °C por cerca de 24 horas (até peso constante, Figura 17).

Figura 17 – Extratos lipídicos antes da derivatização dos ácidos graxos livres para metil ésteres da biomassa de *S. obliquus*.



Fonte: o autor.

A fração lipídica restante no frasco (livre da massa do solvente) foi pesada e a quantidade de lipídios totais foi determinada em % (L_b) de biomassa seca (teor de óleo) e em miligramas de lipídio por litro de cultura microalgais (L_c) de acordo com as equações:

$$L_b = \frac{(F_2 - F_1) \times 100\%}{P_{amostra}} \quad (7)$$

Onde:

L_b = Lipídios totais (%);

F₁ = peso do frasco vazio (mg);

F₂ = peso final do frasco (mg);

P_{amostra} = quantidade de amostra (mg).

$$L_c = \frac{L_b \times B_l}{100\%} \quad (8)$$

Onde:

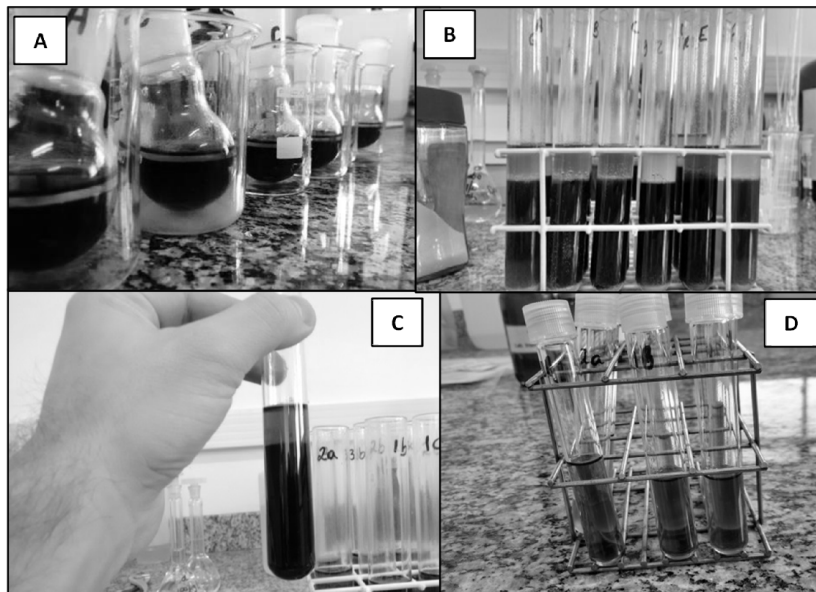
L_c = Lipídios totais (mg L⁻¹)

B_l = Biomassa seca (L)

Após determinação do teor de óleo, este foi derivatizado, para transformar os ácidos graxos livres em metil ésteres de ácidos graxos, adequados à análise por cromatografia gasosa (CHRISTIE, 1992). Para isso, foram utilizados 0,1g do óleo em um balão de fundo redondo de 125 mL. Neste foi adicionado uma solução metanólica (hidróxido de sódio e metanol na proporção de 1:50). A solução foi aquecida a uma temperatura de aproximadamente 60°C em refluxo durante 20 minutos. Quando não foi mais possível a observação de gotas de óleo no balão, foram adicionados 7 mL de uma solução de trifluoreto de boro-metanol (BF₃/metanol), gota a gota, através do condensador e deixado em refluxo por mais 4 minutos. A seguir foi adicionado via condensador foram acrescidos 05 mL de heptano e deixado em refluxo por mais 2 minutos. Após alcançar a temperatura ambiente, foi adicionado uma solução saturada de NaCl. O balão foi levemente agitado. A fase superior da amostra foi coletada em um tubo de ensaio e no mesmo, foi adicionada uma ponta de espátula de sulfato de sódio anidro, o qual foi previamente ativado na estufa à 100°C durante uma hora. O extrato foi

dissolvido com heptano e encaminhado para análise cromatográfica (Figura 18).

Figura 18 – Derivatização do óleo de *S.obliquus*. **A:** balões com solução metanólica (hidróxido de sódio e metanol na proporção de 1:50) **B:** amostras transferidas para tubo de ensaio com sulfato de sódio anidro. **C:** nítida separação das fases (extrato lipídico (superior). **D:** Extratos lipídicos diluídos em Heptano para cromatografia.



Fonte: o autor.

Para as análises cromatográficas foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu QP 2010 Plus equipado com Injetor Automático AOC 20i. As amostras derivatizadas foram analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CGEM) com método AOCS (Ce 1c-89), modificado por AOCS (2008). As condições de análises em Coluna Zbwax (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) foram: Injetor SPL 250°C, injeção Split 1:10, modo de velocidade linear, vazão de 1 mL⁻¹, volume de injeção 1 μL ; temperatura do Forno: 250°C com tempo total de análise de 49,35 minutos, Temperatura detector:260°C (Figura 19). Os padrões de ésteres metílicos foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH e utilizados visando a identificação dos ácidos graxos presentes nas

amostras. Foram injetadas em triplicata alíquotas de 1µL da mistura de padrões e da amostra para identificação dos ésteres metílicos presentes.

Figura 19 - **Esq.:** Cromatografo Shimadzu QP 2010 Plus com Injetor Automático AOC 20i acoplado a Espectrômetro de Massas do Laboratório de Instrumentação Analítica da – UNISC. **Dir.:** Detalhe dos vials contendo as amostras para injeção.



Fonte: Michele Rodrigues.

Determinação de Proteínas (método indireto)

A determinação de proteínas seguiu a metodologia do método indireto, conforme procedimento descrito pelo (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008) primeiramente com determinação do conteúdo de Nitrogênio Total, pelo método de Kjeldahl. Para tal, foram adicionados a um tubo de digestão (em triplicata) uma fração diluída da amostra e avolumada a 50 mL. O mesmo foi feito para o branco (com água destilada e deionizada, em duplicata) e o padrão de H₂SO₄ 0,05N, conforme a fórmula abaixo:

$$N = \frac{m \times vol. A}{53 \times vol. B} \quad (9)$$

Padronização do ácido sulfúrico 0,05 N, onde:

N = normalidade;

m = massa de NaCO_3 usado para solução de 1 L;

vol. A = volume da alíquota da solução padrão usada, em mL;

vol. B = volume de titulante empregado, em mL.

$$F_c = \frac{N_o}{N_e} \quad (10)$$

Fator de correção (F_c) para o ácido sulfúrico 0,05 N, onde:

N_e = normalidade obtida;

N_o = normalidade esperada.

Ao tubo foram adicionadas esferas de ebulição. Em seguida, foram adicionados 10 mL da solução digestora, então o tubo foi acoplado ao bloco digestor previamente aquecido a 250° C. Em seguida a temperatura foi elevada até 375 °C, na qual permaneceu por 30 minutos. Então os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Após o resfriamento foi adicionado ao tubo 10 mL de hidróxido de sódio/tiosulfato de sódio e imediatamente o tubo foi conectado ao destilador automático com adição de 100 mL de água destilada/deionizada ao tubo durante o processo. Ao final, foi recolhido o destilado em um Erlenmeyer com 10 mL de ácido bórico 2%, até obtenção de 100 mL. A este volume foram acrescentadas algumas gotas do indicador misto e foi realizada a titulação com o ácido sulfúrico 0,05 N até viragem para a cor rósea (Figura 20).

Figura 20 – Determinação do conteúdo proteico por método indireto (Nitrogênio Total Kjeldahl), no Laboratório de Ciência dos Alimentos (LACIAL) da UNISC. **Esq.:** tubos com amostra e esferas de ebulição no bloco digestor. **Centro:** Destilação automática do conteúdo dos tubos. **Dir.:** Destilado com solução indicadora após titulação para o ponto de viragem.



Fonte: o autor.

A determinação do conteúdo de Nitrogênio Total foi realizada pela fórmula a seguir:

$$NT(\%) = \frac{V \times 0,14 \times Fc}{P} \quad (11)$$

Teor de nitrogênio total (NT), onde:

V = volume gasto na titulação da amostra;

P = peso da amostra;

Fc = Fator de correção.

Enfim, a obtenção do teor de proteínas foi realizada pela conversão do valor de NT multiplicado por outro fator de conversão para proteínas totais (P_{totais}), uma vez que o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas é de aproximadamente 16%, introduz-se o fator empírico 6,25 para transformar o teor de nitrogênio encontrado em teor de proteínas (método indireto), conforme a fórmula abaixo:

$$P_{totais} (\%) = NT\% \times 4,08 \quad (12)$$

Pigmentos (luteína e betacaroteno)

Extração

Para extração dos pigmentos fotossintetizante foi utilizada a metodologia descrita em Zapata, Rodríguez e Garrido (2000). Uma fração de 200mg de biomassa liofilizada foi misturada com 5mL de metanol 95%. O tubo foi em seguida submetido a sonicação com banho de gelo por 5 minutos. O extrato foi então filtrado com filtro de seringa de polipropileno (MFS HP020, com tamanho do poro de 0,2 μ m) para remoção de resíduos celulares indesejáveis. Foi adicionado 0,2mL de α - uma alíquota de 1 mL do extrato metanólico para evitar distorções na leitura dos primeiros picos de eluição posteriormente. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da injeção. O volume de injeção foi de 200 μ L. Todo o procedimento foi realizado em ambiente com iluminação atenuada.

Quanto à detecção e identificação dos pigmentos, esta foi realizada por espectroscopia de absorvância entre 350 e 750nm. Os cromatogramas de absorvância foram obtidos em diferentes comprimentos de onda (430, 440, 450nm). Em seguida os pigmentos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com comparação de padrões autênticos. Cada pico foi analisado em função de sua homogeneidade espectral com uso de software (Millenium algorithms) e o espectro de absorção foi comparado aos padrões contidos na biblioteca do software previamente. Todas as determinações de pigmentos foram realizadas no Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas do CTTMar da UNIVALI em Itajaí/SC.

Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) dos pigmentos extraídos

O método desenvolvido para análise em HPLC consistiu de um módulo de 2690 separações (com Sistema de mistura em baixa pressão) e um detector Waters 996 (1,2nm de resolução óptica) acoplado a um detector Waters 474 de fluorescência por varredura e interface análoga Stat/In.

Fase estacionária – O fracionamento analítico foi realizado com a utilização de uma coluna Waters Symmetry C8 (150X 4,6mm, 3,5 µm de tamanho de partícula, 100 Å de tamanho do poro). A coluna foi termostatizada a 25°C através de refrigeração por recirculação de água (banho termostatizado Neslab RTE-200 conectado à coluna do HPLC).

Fases móveis – O eluente A consistiu de uma mistura de 50:25:25 v:v:v de metanol:acetonitrila:solução aquosa de piridina (0,25M), com dois eluentes B, onde B1 foi de 20:60:20 v:v:v para metanol: acetonitrila: acetona, e B2 foi de 80:20 v:v de acetonitrila: acetona. Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC. A solução de piridina (0,25M) foi preparada da seguinte forma: 10mL de ácido acético e 20mL de piridina (Merck) foram adicionados a 900mL de água milli-Q (Millipore) em um frasco de 1L e misturados por agitação magnética. O ácido acético foi adicionado até o pH chegar a 5,0. A mistura foi diluída com água até 1L (concentração final de piridina de 0,248M) com nova aferição do pH. Todos os procedimentos foram realizados em capela com exaustão. A solução de piridina foi filtrada (filtro de 0,45 µm GHP Gelman) após mistura com metanol e acetonitrila (eluente A). O fluxo foi mantido em 1mL min⁻¹.

Fluorescência *in vivo* da Clorofila-a

Durante a realização dos experimentos no capítulo 2 também foi feito o acompanhamento da fluorescência da clorofila-a, mediante avaliação diária, sempre as 15h, *in loco* (no próprio sistema HAPS em campo), para minimização da influência ambiental na leitura do parâmetro. As medições foram feitas em duplicata, através de Fluorímetro portátil calibrado (modelo AquaFluor® Handheld Fluorometer – Turner Designs).

Análise dos dados

As variáveis ambientais e de biomassa foram apresentadas na forma de médias diárias com o respectivo desvio padrão das médias, exceto para irradiância e temperatura do meio líquido, onde os dados brutos de todas as séries foram apresentados em gráficos de variação temporal. Os dados referentes à composição elementar da biomassa (C, H e N) e do perfil de ácidos graxos foram apresentados como percentuais correspondentes à média de cada elemento e ácido graxo. Para a análise da variância dos dados em função da presença de CO₂ e do tempo foi utilizada a ANOVA com teste posterior (quando

necessário). Para a análise da variância dos dados bioquímicos da biomassa (teor de óleo, proteínas totais, CHN) foi utilizado o teste-t. todas as análises foram realizadas no software estatístico STATISTICA v.10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Operacionalidade do sistema e evolução das variáveis físico-químicas e ambientais

O sistema mostrou-se de fácil operação, permitindo eficiente acompanhamento tanto das variáveis abióticas como da biomassa. A estrutura do mesmo permite tomadas de dados, a instalação de sensores na rampa ou no reservatório ou ainda em linha na mangueira de ligação entre o reservatório e os tubos. Outra característica que merece destaque é a rápida resposta do sistema a variações ambientais e a manipulações. Em poucos minutos após o início da injeção o pH do meio líquido respondeu reduzindo até valores próximos da neutralidade. No período noturno, quando se espera uma redução natural do pH do meio em função da respiração do cultivo, o desligamento da injeção não fez o pH cair para níveis excessivamente ácidos. Nos testes e bateladas sem injeção de CO₂, no entanto, o pH mostrou-se fracamente tamponado elevando-se muito durante o dia, em função do consumo do CO₂ em concentrações provavelmente limitantes, e reduzindo abaixo da neutralidade a noite. Essa redução noturna devido à respiração provavelmente determinou perda excessiva de biomassa nesses períodos, fato que foi compensado nos experimentos com CO₂ pelo grande incremento da fotossíntese durante o dia. A análise da variância revelou diferença entre as médias de pH pela injeção de CO₂ (Tabela 4).

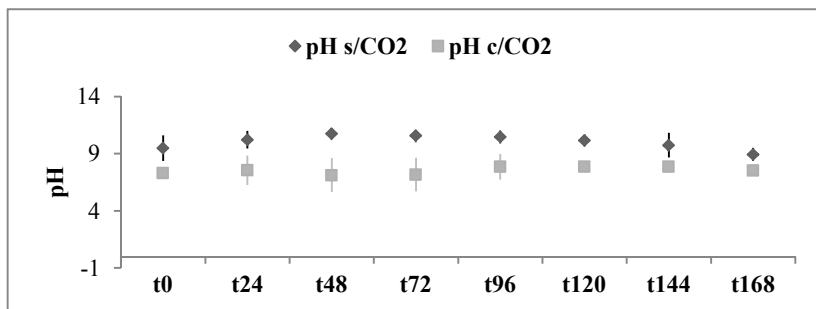
Tabela 4 - Análise da variância (ANOVA; $p < 0,05$) dos dados quanto ao efeito do tempo e do tratamento (injeção de CO₂) para as variáveis físico-químicas de *S. obliquus*. Onde: **GL** = grau de liberdade; **F** = valor do teste F; **p** = valor da probabilidade calculada. Valores em negrito indicam diferença significativa.

		EFEITO		
		TEMPO	TRATAMENTO	TEMPO x TRATAMENTO
VARIÁVEL	GL	1	1	1
Turbidez	F	20,41303	19,48136	17,75090
	P	0,001955	0,002245	0,002943
Condutividade	F	21,0871	20,7636	0,1223
	P	0,001774	0,001858	0,035573
pH	F	0,0000	8,8009	0,6840
	P	0,995436	0,017963	0,432204

Fonte: o autor.

A amplitude dos valores de pH nos experimentos sem CO₂ foi de 8 a 10, enquanto nos experimentos com CO₂ foi em torno de 7,3 a 7,5 (Figura 21). Essa diferença revelou uma condição tampão promovida pelo aporte de CO₂, onde o aumento da fotossíntese não alcalinizou o meio pelo consumo do CO₂, mantendo este na faixa da neutralidade, ao contrário do tratamento sem o aporte, onde houve elevação significativa do pH.

Figura 21 - Comportamento do pH ao longo do período experimental (t) de 168 horas de cultivo de *S. obliquus*. Onde: s/CO₂ (tratamento sem injeção de CO₂); c/CO₂ (tratamento com injeção de CO₂). Cada ponto no gráfico representa a média diária correspondente à média (e seus respectivos desvios-padrão) das três repetições para cada tratamento.



Fonte: o autor.

Essa elevação de pH em cultivos algais ao longo do tempo é esperada em função do consumo de CO₂ e consequente alcalinização do meio, servindo a injeção de CO₂ não só como uma maior oferta de carbono inorgânico assimilável, mas como uma forma de manter o pH em níveis adequados ao metabolismo algal, favorecendo também a solubilidade e biodisponibilidade de alguns sais nutrientes (buffering system). O equilíbrio químico do carbono inorgânico na coluna d'água está diretamente relacionado ao pH (ANDERSEN, 2005; RICHMOND, 2004), e pode ser expresso segundo as reações a seguir:



Estas reações demonstram que durante a fixação fotossintética do CO_2 , íons OH^- acumulam no meio de cultivo levando a um gradual aumento de pH. Não é incomum a verificação de valores do pH em torno de 11 em sistemas com grande densidade e produtividade algal que não foram suplementados com CO_2 (RICHMOND e GROBBELAAR, 1986). Uma vez que o processo fotossintético resulta no aumento de pH, o oposto é verdadeiro quanto a liberação de CO_2 durante a respiração. Durante a noite a fotossíntese é cessada e a concentração de CO_2 aumenta em função da respiração mitocondrial e do equilíbrio com a sua concentração atmosférica. Isto promove a redução dos valores de pH pela maior concentração de íons H^+ (acidificação) no meio de cultivo (MARCHIN et al., 2015). Sobretudo a influência desta liberação é pequena, pois via de regra a respiração no escuro corresponde a menos que 10% do total da produção fotossintética (GROBBELAAR e SOEDER, 1985). De Marchin e colaboradores (2015) testaram duas densidades iniciais no cultivo de *S. obliquus* (0,4 e 0,05 g L⁻¹), em TLC sem aporte de CO_2 e observaram que nos cultivos iniciados com menor densidade o pH aumentou gradualmente com o aumento da concentração celular, ao passo que no cultivo iniciado com maior densidade o pH atingiu um platô igual a 11. Concluíram que a ausência do platô no cultivo de menor densidade indica que a disponibilidade de carbono inorgânico dissolvido foi suficiente para a demanda fotossintética, sendo necessário aporte de CO_2 somente em densidades maiores que 0,2 gL⁻¹.

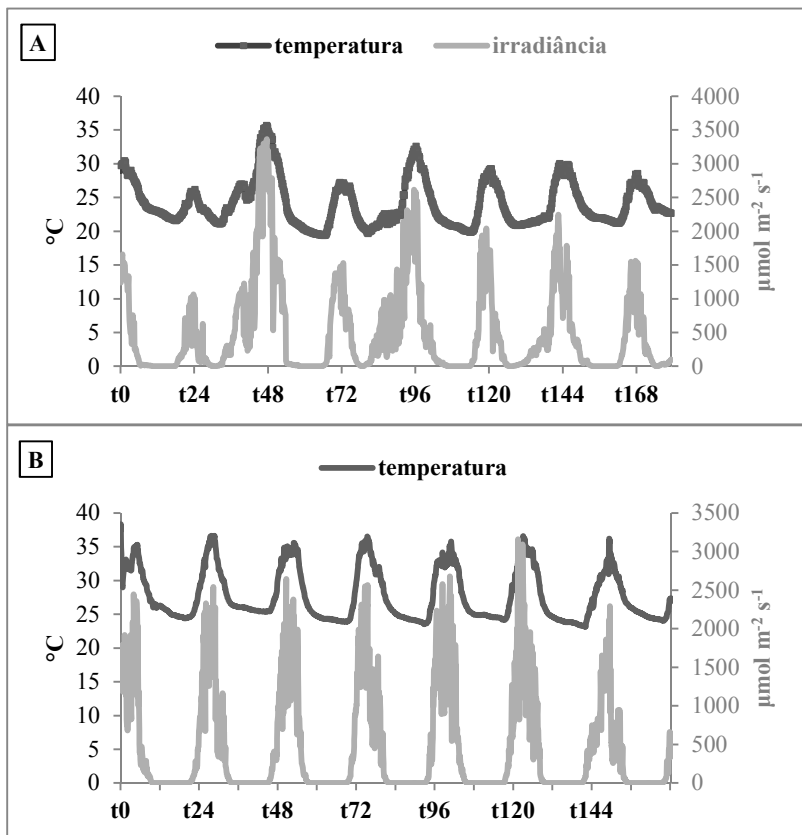
É reconhecido comumente o fato de que em pH superior a 9, não há praticamente CO_2 disponível no cultivo e a totalidade do Carbono Inorgânico Dissolvido está presente sob a forma de HCO_3^{3-} e CO_3^{2-} (KNUD-HANSEN et al., 1998). O fato de espécies como *S. obliquus* apresentarem crescimento em alto pH, em contraste com outras espécies como *Chlamydomonas reinhardtii* é, segundo Thielmann e colaboradores (1990), devido provavelmente à existência de uma bomba adicional para transporte de HCO_3^{3-} nas células. No presente trabalho, especialmente no cultivo sem CO_2 o pH aumentou gradativamente com a biomassa e atingiu um platô em torno de 10 após 48h e se manteve assim até o 5º dia de cultivo, diferentemente do comportamento reportado por De Marchin e colaboradores (2015). Foi observado que o

cultivo de *S.obliquus* necessita de CO₂ mesmo em baixa densidade, sendo que apenas o equilíbrio do gás estabelecido pelas trocas gasosas do cultivo com o meio atmosférico parece não ter suprido suficientemente a disponibilidade de carbono inorgânico dissolvido. Fato corroborado pela produtividade significativamente baixa do cultivo sem CO₂ e também pelo comportamento do cultivo na presença de CO₂ onde o pH foi mantido próximo à faixa ótima relatada pela literatura para o cultivo do gênero *Scenedesmus* (CHANDRA et al., 2016; KNIE e LOPES, 2004; MANDOTRA et al., 2016).

A análise da variância revelou diferenças significativas para turbidez e condutividade tanto pelo efeito do tempo como pelo aporte de CO₂ (tabela 4). A amplitude dos valores foi diferente entre os tratamentos, onde a ausência de CO₂ proporcionou valores máximos entre 50 e 60 UNT, enquanto que com CO₂ os valores ficaram entre 400 e 700 UNT. Essa diferença reflete o maior incremento de biomassa nos experimentos enriquecidos com CO₂. A turbidez também mostrou considerável variação nictemeral. Em geral os valores eram maiores durante o dia, especialmente nos experimentos sem CO₂. Uma possível explicação para esse comportamento é a perda de biomassa durante o período noturno (morte celular, consumo de reservas, alterações na composição celular) causada pela respiração, especialmente quando os cultivos já se apresentavam mais densos, dado que a turbidez é influenciada positivamente pelo número e tamanho de células em suspensão. A condutividade teve padrão inverso ao da turbidez, apresentando uma diminuição ao longo do tempo em ambos os tratamentos, de 1,7 para 0,2 e de 3,4 para 1,7 $\mu\text{S cm}^{-2}$ nos tratamentos sem aporte e com aporte de CO₂, respectivamente, refletindo o consumo de nutrientes (sais) com o crescimento da biomassa.

A temperatura média diária do ar mostrou valores típicos para os períodos em que os experimentos foram realizados, variando entre 19°C e 26°C nos experimentos sem CO₂, típica variação regional do período de transição entre primavera e verão, e entre 20°C e 28°C nos experimentos com CO₂, período de verão. A figura 22 mostra a variação temporal detalhada da irradiância e temperatura do meio líquido nos dois tratamentos. Os valores foram menores nos experimentos sem CO₂, realizados em período de transição entre primavera e verão, do que nos com CO₂, realizados em período de verão. Porém em ambos as variações não extrapolaram os limites tolerados por *S.obliquus*.

Figura 22 - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e irradiância ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) registradas continuamente por dispositivo com datalogger, durante as repetições do tratamento sem CO_2 (A) e com injeção de CO_2 (B). Cada ponto corresponde a uma média de três registros (um de cada repetição experimental).



Fonte: o autor.

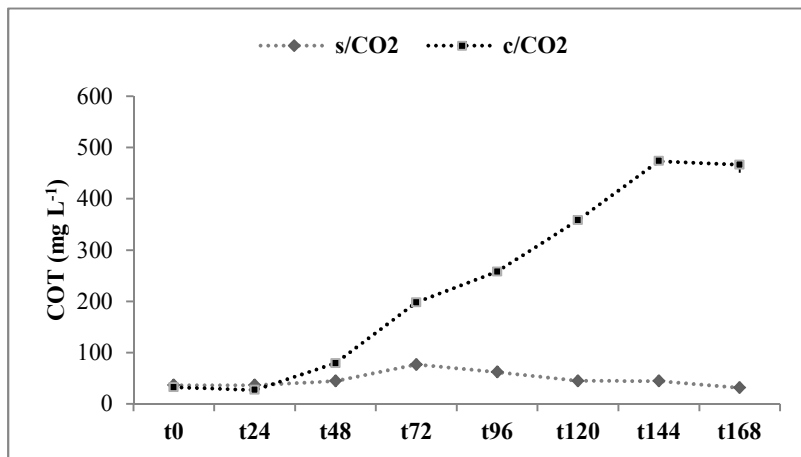
Apesar do volume relativamente baixo do sistema testado e da presença da rampa com baixa lâmina de água, a temperatura do meio líquido não atingiu valores excessivamente elevados ao ponto de representar, na condição de pico de verão, temperaturas limitantes ou letais para as microalgas. Na condição de maior insolação e temperatura do ar, a temperatura do meio líquido chegou a atingir 43°C , porém esse aquecimento não comprometeu o crescimento da espécie testada. Aparentemente, o fluxo rápido compensa o aquecimento excessivo pela

energia solar, porém esse aspecto deve ser considerado com cuidado se a espécie cultivada no sistema for menos tolerante do que *S. obliquus* à temperaturas elevadas. Em relação à temperatura, o gênero *Scenedesmus* é cosmopolita e apresenta crescimento em ampla faixa de temperatura, a qual não varia significativamente entre 10 e 30°C (CABELLO et al., 2015; XIN; HONG-YING; YU-PING, 2011; XU et al., 2011). Algumas espécies deste gênero apresentam ótimo crescimento numa faixa entre 20 e 30°C (MEYEN, 1829; XIN et al., 2011). Isso é muito relevante para sistemas de cultivo abertos (outdoors), uma vez que a temperatura é um fator ambiental importante para o crescimento (MARTÍNEZ et al., 1999; MATA et al., 2013; VOLTOLINA et al., 2005).

Conforme Doucha e Livansky (2006), o efeito “radiador” do cultivo proporcionado durante as trocas de calor com o meio e evaporação da água é significativo. Segundo os autores, mesmo em dias ensolarados de muito calor (auge do verão), a temperatura máxima da coluna d’água de 6 a 8 mm de cultivo não excedeu 38°C. A mesma característica do sistema atua na elevação da temperatura à faixa ótima logo no início do período diurno após resfriamento noturno, enquanto que o resfriamento natural ao fim da tarde é relativamente gradual, fato que favorece a adaptação do metabolismo celular.

O carbono orgânico total (COT) mostrou um comportamento irregular nos experimentos sem CO₂, onde não foi verificado um incremento progressivo significativo nos valores ao longo tempo. Já nos experimentos com CO₂ o comportamento dessa variável mostrou-se mais regular, com incremento progressivo ao longo do tempo (Figura 23). Ressalta-se também a amplitude dos valores entre os dois tipos de experimento, onde os valores oscilaram de 30 a 76 mg L⁻¹ nos experimentos sem CO₂ e de 27 a 473 nos experimentos com CO₂.

Figura 23 - Comportamento do carbono orgânico total (COT – mg L^{-1}) incorporado na biomassa de *S. obliquus* nos dois tratamentos testados durante 168 horas. Onde: s/ CO_2 = tratamento sem o aporte de CO_2 ; c/ CO_2 = tratamento com aporte de CO_2 . Cada ponto corresponde a uma média de três registros (um de cada repetição experimental).



Fonte: o autor.

Biomassa, produtividade e eficiência energética do cultivo

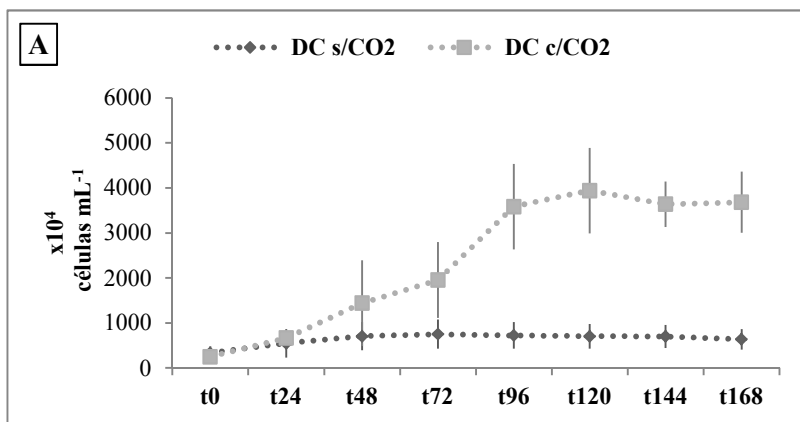
Durante todos os experimentos de crescimento realizados, o cultivo no sistema proposto não apresentou contaminação por outros táxons de microalgas ou por zôoplancton. Este fato foi comprovado por avaliações diárias de amostras ao microscópio. A análise da variância dos dados de densidade de células e de biomassa revelou influência do tempo e do aporte de CO_2 no crescimento de *S. obliquus* (Tabela 5). A amplitude dos valores máximos foi até 6 vezes maior nos experimentos com CO_2 do que naqueles sem a injeção desse gás. Também foi possível visualizar que o incremento de biomassa se prolonga mais nos experimentos com CO_2 , indicando menor limitação ao crescimento algal nessa condição. Já nos experimentos sem CO_2 o incremento de biomassa foi menor (Figura 24). Uma provável explicação para esse menor desempenho é a baixa irradiância nos dois primeiros dias de cultivo, que pode ter comprometido a fase de adaptação inicial do cultivo ao sistema. Após esses primeiros dias, os cultivos sem CO_2 mostraram pouca variação na biomassa, indicando limitação do crescimento.

Tabela 5 - Análise da variância (ANOVA; $p < 0,05$) dos dados quanto ao efeito do tempo e do tratamento (injeção de CO₂) para as variáveis de crescimento de *S. obliquus*. Onde: **GL** = graus de liberdade; **F** = valor do teste **F**; **p** = valor da probabilidade calculada. Valores em negrito indicam diferença significativa.

EFEITO				
		TEMPO	TRATAMENTO	TEMPO x TRATAMENTO
VARIÁVEL	GL	1	1	1
Biomassa	<i>F</i>	91,3546	83,9560	76,3995
	<i>p</i>	0,000012	0,000016	0,000023
Densidade Celular	<i>F</i>	17,52912	11,46085	12,27844
	<i>p</i>	0,003051	0,009565	0,008031

Fonte: o autor.

Figura 24 - Densidade celular (A) e biomassa (B) verificadas nos cultivos de *S. obliquus* sem o aporte de CO₂ e com aporte ao longo do tempo (t) de 168 horas. Onde: DC s/CO₂ = Densidade celular (nº de células mL⁻¹) no tratamento sem aporte de CO₂; DC c/CO₂ = Densidade celular no tratamento com aporte de CO₂; BIOM s/CO₂ = Biomassa seca (g L⁻¹) no tratamento sem aporte de CO₂; BIOM c/CO₂ = Biomassa seca no tratamento com aporte.



Fonte: o autor.

De maneira geral as variáveis indicativas de crescimento algal (Biomassa, DC, TOC e TURB) aumentaram ao longo do tempo. Porém, é nítida a diferença em ordem de grandeza nessas variáveis entre os dois tipos de condição testadas, onde os experimentos com injeção de CO₂

mostraram níveis de 3 a 6 vezes maiores que no experimento sem CO₂, dependendo da variável considerada. Analisando os perfis de DC e biomassa percebe-se que nos experimentos sem CO₂ ocorre uma estabilização ou queda nos valores já a partir do 3º dia, enquanto nos experimentos com CO₂ o crescimento se estendeu pelo menos até o 6º dia. Aparentemente o rápido aumento do pH em função da fotossíntese e a limitação de aporte extra de carbono têm grande influência para o cultivo de *S. obliquus* no sistema.

Os valores de TOC nos experimentos com CO₂ mostraram incremento praticamente até o final. Já nas bateladas sem CO₂, houve baixo incremento. Além disso os valores de COT nos experimentos com CO₂ são muito superiores aos verificados nos experimentos sem CO₂. Essa condição corrobora o baixo nível de crescimento e incorporação de carbono na condição sem CO₂ de acordo com os resultados da biomassa e DC e turbidez. Possivelmente, as limitações ao crescimento vigentes nesses experimentos sem CO₂ induzem a alterações na qualidade da biomassa (células mortas ou despigmentadas) levando a variações erráticas no conteúdo de carbono, repercutindo em oscilações nos valores de TOC e turbidez. Destaca-se nesse sentido que a amplitude de queda nos valores de DC é menor que nas demais variáveis, ou seja, não é a quantidade de células que diminui ou oscila e sim características qualitativas das mesmas.

Em relação à produtividade, partindo das considerações expostas acima, sobre o comportamento das variáveis em especial a biomassa, ficou nítida a baixa produtividade na ausência de CO₂. A presença de CO₂ proporcionou um ganho em biomassa e consequente produtividade por área significativamente maior, onde o aporte de CO₂ proporcionou em média 7,08 g m⁻² d⁻¹ contra 0,77 g m⁻² d⁻¹ sem o gás, ou em termos de produtividade volumétrica: 196,6 g m⁻³ d⁻¹ contra 25,6 g m⁻³ d⁻¹ respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Biomassa e produtividade líquida do sistema híbrido nos dois tratamentos testados. Onde: X_0 = Biomassa inicial; X_t = Biomassa final; t = Tempo de cultivo onde foi obtida a máxima biomassa; RB_t = Rendimento em biomassa estimado para o tempo t ; PAR_{int} = Energia luminosa integrada até o tempo t ; PL = Produtividade líquida; PV = Produtividade volumétrica; EEC = Eficiência energética do cultivo; DP = Erro padrão da média. Médias seguidas por (*) , nas colunas, apresentam diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Experimento	X_0 (g L ⁻¹)	X_t (g L ⁻¹)	t (dias)	RB_t (mg)	PAR_{int} (MJ)	PL (g m ⁻² d ⁻¹)	PV (g m ⁻³ d ⁻¹)	EEC (mg MJ ⁻¹)
s/ CO₂								
média	0,11 7	0,19 1	3,7	74	34,34	0,77 *	25,60*	2,54*
DP	0,01 2	0,01 3	0,66 7	1,155	8,929	0,11 9	6,745	0,770
c/ CO₂								
Média	0,13 7	1,16 9	5,25	1032	50,65	7,08 *	196,57 *	22,18 *
DP	0,02 2	0,15 1	0,00 0	142,28 6	12,57 6	0,97 5	27,102	3,653

Fonte: o autor.

Mesmo considerando que a irradiância e a duração do período diurno, em termos de insolação diária, tenham sido consideravelmente maiores nos experimentos com CO₂, percebe-se que não foi só a maior irradiância que determinou melhor desempenho em produtividade e biomassa no sistema. Isso pode ser visto de forma clara nos dados de eficiência energética dos cultivos (EEC, Tabela 6), um parâmetro ilustrativo calculado para verificar a produtividade do sistema, pensando ou levando em consideração as diferenças de irradiância nos diferentes experimentos. A EEC de *S. obliquus* no sistema foi em média 3 vezes maior nos experimentos com CO₂ do que naqueles sem a injeção do gás, mostrando novamente a forte influência da injeção do CO₂ na produtividade. Tais resultados mostram a natureza sinérgica que a disponibilidade de CO₂ e a elevada irradiância exercem em sistemas de cultivo híbridos com o aqui testado sobre a produtividade.

De Marchin e colaboradores (2015) operaram um sistema TLC de 35m², com volume total de 4000L, usando também *S. obliquus*, com injeção de CO₂, partiram de 0,4 g L⁻¹ alcançaram a biomassa de 2,4 g L⁻¹ em 14 dias, contra 1,0 g L⁻¹ sem aporte do gás no mesmo período. Os

autores demonstraram que a produtividade do cultivo massivo de *S. obliquus*, em TLC, sob alta irradiância solar é limitada pela disponibilidade de CO₂, para densidades superiores a 0,25 g L⁻¹, concluindo que cultivos microalgais de alta densidade, em TLC, devem ser suplementados com CO₂ para garantir eficiência de utilização da luz na produção de biomassa. No presente trabalho, entretanto mesmo com a utilização do CO₂ a produtividade alcançada foi menor (em média 1,17 g L⁻¹, Tabela 6), porém, obtida em 1/3 do tempo se comparada ao trabalho citado. A produtividade obtida neste trabalho foi diferente também da reportada por Doucha e Livansky (2006), que cultivaram *Chlorella* sp., também com aporte de CO₂ em um TLC com 224 m² e obtiveram uma produtividade máxima de 23,5 g m² dia⁻¹. O mesmo aconteceu quando comparado a Masojidek e colaboradores (2011), que em um TLC de 24 m², com a mesma microalga e aporte de CO₂ obtiveram 18,7 g m² dia⁻¹. Grobbelaar e colaboradores (1995), com um cultivo misto de *S.obliquus* e *Chlorella* sp., obtiveram uma produtividade de 18,36 g m² dia⁻¹ com uso de CO₂ trabalhando com TLC. Em outro trabalho, comparando um TLC (1200L) com um Raceway (4400 L), Morales-Amaral e colaboradores (2015) obtiveram no cultivo de *Scenedesmus* sp., em sistema semicontínuo alimentado com efluente e CO₂, as produtividades de 42 g m² dia⁻¹ e 24 g m² dia⁻¹ respectivamente. Por outro lado, Jerez (2015), trabalhando com *Chlorella fusca* e comparando três unidades de TLC, duas na Espanha e uma na República Tcheca, obteve uma produtividade volumétrica de 3,65g L⁻¹d⁻¹ na República Tcheca e 0,15 e 0,08 g L⁻¹ d⁻¹ para as unidades na Espanha. Todos os trabalhos citados foram realizados em épocas do ano com irradiância solar semelhante à dos experimentos deste trabalho, porém um fator que parece ter influência significativa é o tamanho da rampa. Nos trabalhos citados acima, todas as rampas apresentaram maior área do que a testada neste trabalho. Este é mais um fator que deve ser estudado para o cultivo de *S.obliquus* no sistema híbrido proposto. Tal característica, segundo Livansky e Doucha (1996), promove maior aproveitamento da luz e junto com a turbulência proporciona maiores produtividades.

A tabela 7 apresenta dados comparativos de produtividade para *S. obliquus* em diferentes tipos de fotobiorreatores.

Tabela 7 - Dados comparativos de produtividade de microalgas, em especial *S. obliquus*, em diferentes tipos de fotobiorreatores.

Espécie de microalga	Tipo de reator	Volume (L) ou área (m²) de cultivo	Prod. Vol. (g L⁻¹ day⁻¹)	Prod. área (g m⁻² day⁻¹)	Referência
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Híbrido	180 L	0,23	7,08	Presente trabalho
<i>S. obliquus</i>	TLC	4000L	2,4	-	(MARCHIN; ERPICUM; FRANCK, 2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Bubble column	0.8L	0.16	-	(TANG et al., 2011)
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	Tubular PBR	1.0L	0.84 – 0.14	-	(HO et al., 2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Erlenmeyere	0.5L	0.048-0.99	-	(SIBI, 2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Polyetilene bags	15L	0.14	-	(ABOMOHRRA et al., 2014)
<i>Chlorella</i> sp	TLC	224m ²	-	23,5	(DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2006)
<i>Chlorella</i> sp	TLC	24m ²	-	18,7	(MASOJIDEK et al., 2011)
<i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 22	Tubular PBR	1.8L	2.12	-	(MORAIS & COSTA, 2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Tubular PBR	5.3L	0.145	-	(THIANSATHIT et al., 2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Tubular PBR	200L	0.009 – 0.016	-	(BRENNAN & OWENDE, 2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Erlenmeyere	3.0L	0.25-0.39	-	(VOLTOLINA et al., 2005)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Tubular PBR	6.0L	0.09-0.14	-	(MORAIS & COSTA, 2007b)

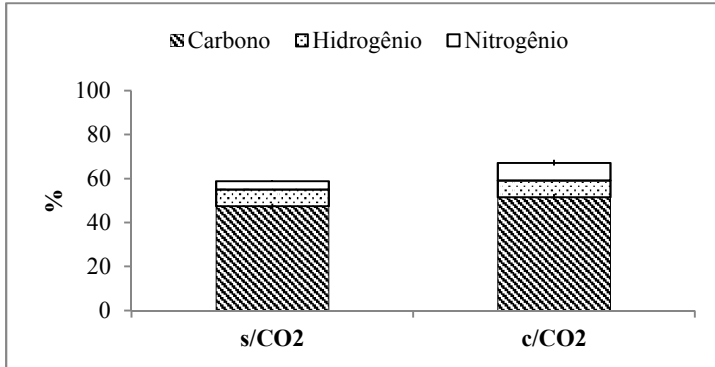
<i>S.obliquus</i> e <i>Chlorella</i> sp.	TLC	2550L	-	18,36	(GROBBELAAR et al., 1995)
<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	Raceway pond	300L	-	1.7-16.92	(GROBBELAAR et al., 1990)
<i>Scenedesmus</i> sp.	TLC	1200L	-	42	(MORALES- AMARAL et al., 2015)
<i>Chlorella</i> <i>fusca</i>	TLC	225	-	3,65	(JEREZ, 2015)
<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	Fiberglass closed tanks	300L	-	9.0	(HARTIG et al., 1988)

Fonte: o autor.

Análise da biomassa

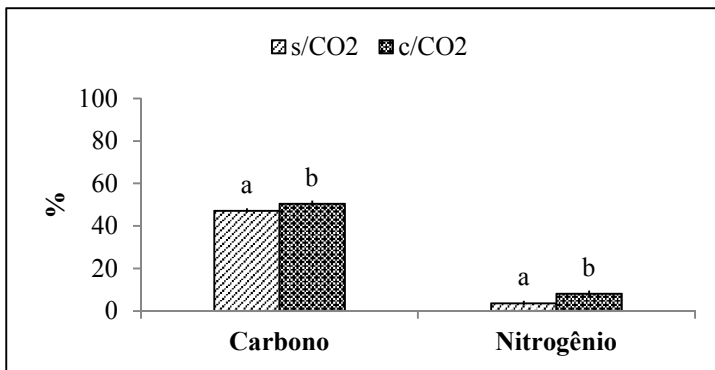
A análise elementar da biomassa seca (CHN) mostrou valores similares em todos os experimentos, com em média 61,5 % da biomassa sendo composta por carbono, nitrogênio e hidrogênio (Figura 25). Essa proporção de CHN foi superior nos experimentos com CO₂, estando essa diferença mais relacionada ao nitrogênio e ao carbono, com pouca diferença nos valores de hidrogênio conforme revelou a análise da variância (Figura 26). Tal condição indica uma maior síntese de matéria orgânica na condição de crescimento com CO₂, o que era esperado devido a maior eficiência de crescimento e produtividade. A maior diferença relacionada ao nitrogênio, por sua vez, indica que na condição com CO₂ há relativamente uma maior síntese de proteínas.

Figura 25 – Conteúdo elementar (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio) da biomassa seca de *S. obliquus*. Onde: S/CO₂: experimentos sem injeção de CO₂; C/CO₂: experimentos com injeção de CO₂. As barras representam os valores médios das três repetições de cada tratamento.



Fonte: o autor.

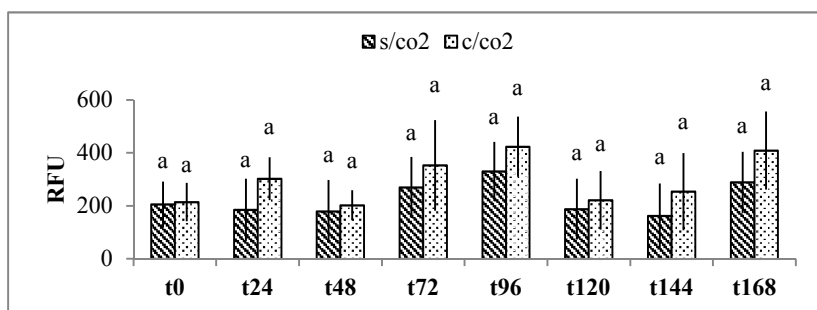
Figura 26 - Valores médios (%) de Carbono e Nitrogênio na biomassa de *S. obliquus*. Onde: s/CO₂ = tratamento sem injeção de CO₂; c/CO₂ = tratamento com injeção de CO₂. letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste-t bicaudal com teste posterior de Welch ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

Outra possibilidade se refere à maior concentração de clorofilas nos cultivos com CO₂ (Figura 27), porém não significativamente, como resposta a melhor condição de crescimento, já que o nitrogênio compõe cerca de 7-10% da massa molecular das clorofilas (HU, 2004; KUMAR SAHA; UMA; SUBRAMANIAN, 2003).

Figura 27 - Fluorescência da clorofila-a de *S. obliquus*. Valores diários coletados sempre as 15h, medidos *in loco*. Valores expressos em Unidade Bruta de Fluorescência (Raw Fluorescence Unit – RFU). As barras representam a média (com seus respectivos desvios-padrão) correspondente às três repetições de cada tratamento, sempre no mesmo horário a cada 24h. Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença significativa ($p < 0,05$).

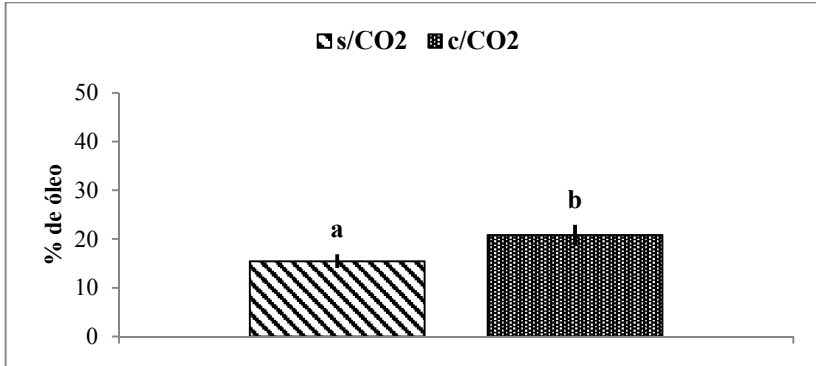


Fonte: o autor.

Oleoquímica - teor de óleo e perfil de ácidos graxos de *S. obliquus*

O teor de lipídeos na biomassa seca de *S. obliquus* mostrou diferenças entre os experimentos sem e com CO₂, com valores maiores quando houve injeção de CO₂. O teor médio nos experimentos com CO₂ foi de cerca de 21%, contra 15% nos experimentos sem CO₂ e a análise estatística das médias revelou diferença significativa ($p < 0,0001$), como pode ser visualizado na figura 28. O resultado também indica uma maior assimilação de carbono na condição com suprimento adicional de CO₂.

Figura 28 - Teor de lipídeos na biomassa seca de *S. obliquus*. Onde: S/CO₂ = tratamento sem injeção de CO₂; C/CO₂: tratamento com injeção de CO₂. As barras correspondem à média (e respectivos desvio-padrão) das três repetições de cada tratamento (com três extrações para cada repetição, n = 9); letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste-t bicaudal com teste posterior de Welch (p<0,05).



Fonte: o autor.

Em relação à literatura, o teor de óleo encontrado ficou situado dentro de uma média para espécies do gênero. Em uma extensa revisão feita por Mata e colaboradores (2010), foi relatado que o teor de óleo médio na biomassa de *S. obliquus* está entre 11,0 – 55,0%, para *S. quadricauda* entre 1,9 – 18,4% e para *Scenedesmus* sp. entre 19,6 – 21-1%. No presente trabalho, a cepa de *S.obliquus* testada apresentou um teor médio de 20,8% no cultivo com CO₂.

Em termos gerais, a cepa de *S. obliquus* utilizada nos experimentos como HAPS apresentou maior proporção de ácidos graxos insaturados nos lipídeos totais, com maior quantidade destes nos cultivos com injeção de CO₂ (Tabela 8).

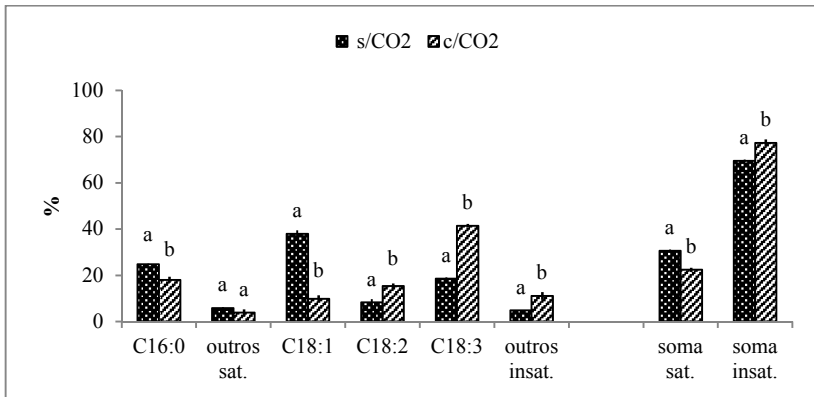
Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos do extrato lipídico de *S. obliquus*. Onde: s/CO₂ = média do ácido graxo no tratamento sem injeção de CO₂; c/CO₂ = média do ácido graxo no tratamento com injeção de CO₂; dp = Desvio-padrão; soma saturados = somatório dos valores médios de ácidos graxos saturados (e respectivo desvio-padrão) para cada tratamento; soma insaturados = somatório dos valores médios de ácidos graxos insaturados (e respectivo desvio-padrão) para cada tratamento; ISO = isômero.

Fórmula Química	Ácido graxo	s/CO₂	dp	c/CO₂	dp
C12:0	Ác. láurico	0,035	0,026	0,379	0,016
C14:0	Ác. mirístico	0,536	0,090	0,834	0,239
C15:0	Ác. pentadecílico	0,097	0,013	0,131	0,014
C16:0	Ác. palmítico	24,738	0,270	21,177	4,203
C16:1	Ác. palmitoléico	0,577	0,020	2,877	1,242
C16:2	Ác. hexadecadienóico	0,853	0,173	1,690	0,478
C16:3	Ác hexadecatrienóico	2,091	0,020	3,717	1,968
C17:0	Ác. margárico	0,346	0,078	0,219	0,050
C18:0	Ác. esteárico	4,783	0,272	2,287	1,361
C18:1	Ác. oleico	37,887	1,616	14,773	8,067
C18:1 ISO	Ác. elaídico	1,050	0,037	0,893	0,081
C18:2	Ác. linoleico	8,255	1,404	15,422	1,061
C18:3 ISO	Ác. linolenelaídico	0,207	0,066	0,833	0,249
C18:3	Ác. linolênico	18,544	0,556	34,767	12,223
soma saturados		30,536	±0,580	25,028	±5,522
soma insaturados		69,464	±0,580	74,972	±5,522

Fonte: o autor.

A diferença marcante no perfil entre os dois tipos de condição de cultivo foi quanto aos ácidos graxos insaturados com 18 carbonos. Na condição sem CO₂ o ácido oleico (C18:1), que é monoinsaturado, foi predominante, ao passo que na condição com CO₂, o ácido α -linolênico (C18:3), tri-insaturado, foi o mais abundante (Figura 29).

Figura 29 - Perfil de ácidos graxos predominantes no extrato de lipídios totais da biomassa de *S. obliquus*. Onde: S/CO₂: experimentos sem injeção de CO₂. C/CO₂: experimentos com injeção de CO₂. As barras representam as médias de três determinações para cada repetição de tratamento (excluídos os valores outliers). Letras diferentes sobre as barras (para cada ácido graxo independentemente) correspondem à diferença significativa entre as médias dos ácidos graxos para os respectivos tratamentos, pelo teste-t bicaudal com teste posterior de Welch ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

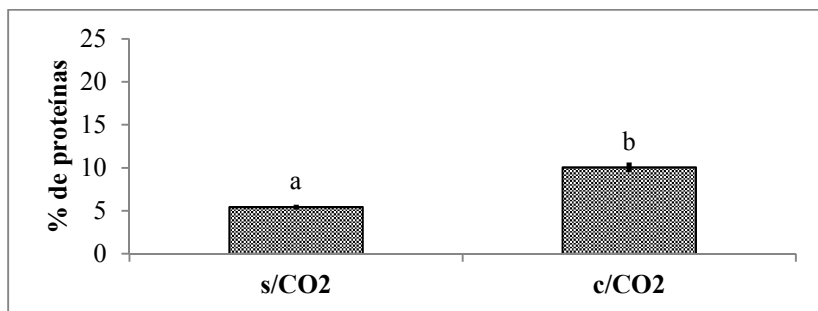
O ácido linoleico (C18:2) também apresentou maior proporção nos experimentos com CO₂. Ou seja, a condição com CO₂ determinou maior tendência a insaturações. Entre os ácidos graxos saturados o palmítico (C16:0) foi o mais abundante em ambas as condições, com pouca variação. Ácidos graxos insaturados tendem a aumentar sua proporção em microalgas sob condições ótimas de nutrientes e na fase exponencial de crescimento, ao passo que condições mais estressantes e a estagnação de crescimento típica da fase estacionária, favorece a síntese de ácidos graxos saturados ou diminui a tendência a novas insaturações (SIRON; GIUSTI; BERLAND, 1989; YANG et al., 2013). Embora vários fatores controlem ou influenciem a síntese e interconversão de ácidos graxos em microalgas, há certo consenso de que os saturados são sintetizados mais em situação de estresse como reserva energética, ao passo que em condições de crescimento pleno os insaturados tem a concentração aumentada (GUSCHINA; HARWOOD, 2006; MORAIS; COSTA, 2007; STEPHENSON et al., 2010). Nesse sentido, a composição de ácidos graxos encontrada neste trabalho

indicou possivelmente uma influência do CO₂ para a geração de células em crescimento pleno.

Teor de proteínas totais

O teor de proteínas na biomassa seca de *S. obliquus* apontou diferenças pronunciadas entre os experimentos crescidos sem e com CO₂, com valor em média cerca de 1,6 vezes maior na biomassa obtida com CO₂ (Fig 30). Novamente, este resultado aponta para uma condição de crescimento menos estressante e com maior produção de matéria orgânica.

Figura 30 - Teor de proteínas na biomassa de *S. obliquus*. Onde: s/CO₂: experimentos sem injeção de CO₂. c/CO₂: experimentos com injeção de CO₂, letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste-t bicaudal com teste posterior de Welch ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

Pode se também verificar que o conteúdo proteico quantificado, mesmo em presença de CO₂, ficou próximo ao reportados por alguns trabalhos na literatura (Tabela 9). Cabe salientar que o meio de cultivo utilizado neste trabalho merece atenção especial, pois trata-se de uma alternativa de baixo custo, de balanço nutricional inferior a maioria dos experimentos reportados, os quais foram desenvolvidos em condições controladas e com meio nutritivo de maior qualidade.

Tabela 9 – Comparação dos valores de proteínas quantificados para *S. obliquus* em relação a outros trabalhos da literatura. Adaptado a partir de (VARSHNEY et al., 2016).

Microalga	Vol. Máx. de CO ₂ testado (% v/v)	Máx. biomassa alcançada (g L ⁻¹)	Proteínas totais (%)	Referência
<i>S. obliquus</i>	nd	1,308 ±0,06	10,05 ±1,4	Presente trabalho (VARSHNEY et al., 2016)
<i>Acutodesmus</i> sp.	20	1,646 ±0,005	38,78 ±0,8	(BASU et al., 2013)
<i>S. obliquus</i> SAI	13,8 ±1,5	1,83	9,48 ±1,65	(HO; CHEN; CHANG, 2012)
<i>S. obliquus</i> CNW-N	2,5	2,10 ±0,08	nd	(HO; CHEN; CHANG, 2012)
<i>S. obliquus</i> ESP-7	2,5	1,34 ±0,12	nd	(WANG; LAN; HORSMAN, 2012)
<i>S. dimorphus</i>	2,0	Nd	15-33	(MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012)
<i>S. obliquus</i>	0,038	Nd	31,8 ±0,5	

Fonte: o autor.

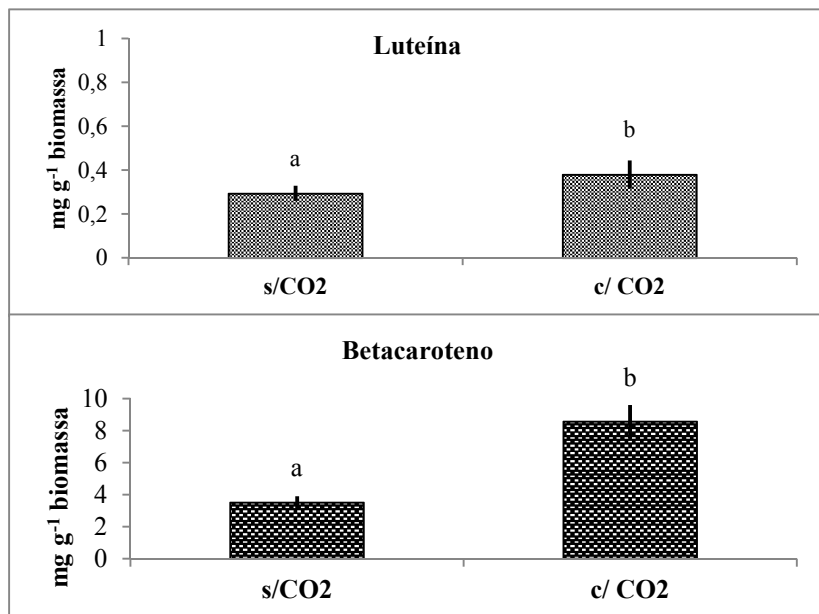
Conteúdo de Luteína e Betacaroteno

O mesmo padrão de maiores concentrações nos cultivos com CO₂ foi observado também para os pigmentos, especialmente para o betacaroteno. A análise da variância das médias revelou a influência da injeção de CO₂, onde observou-se mais que o dobro da concentração de betacaroteno na biomassa obtida com injeção de CO₂. Já a luteína, não apresentou aumento significativo no tratamento com CO₂ (Figura 31).

A produção de betacaroteno em microalgas é sobre-estimulada em condições de estresse (RICHMOND; HU, 2013). Nesse sentido, a maior concentração desse pigmento na biomassa obtida com injeção de CO₂ poderia estar indicando que tal condição de cultivo não é ideal (Figura 31). Porém, é importante perceber que a indução de estresse em microalgas para a produção de betacaroteno se faz em espécies, ditas

superprodutoras desse pigmento como resposta de proteção contra estresse extremo (ex. meio hipersalino).

Figura 31 - Conteúdo de luteína e betacaroteno na biomassa de *S.obliquus*. Onde: s/CO₂ = tratamento sem injeção de CO₂; c/CO₂ = tratamento com injeção de CO₂. As barras representam a média de três extrações para cada repetição do tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre as médias, pelo teste-t ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

Basu et al. (2013), trabalhando com uma cepa de *S. obliquus* (SA1) cultivou a mesma em duas condições, em alta temperatura e concentração de CO₂ (40°C e 13,5% CO₂), que representam uma simulação de meio enriquecido com emissões gasosas industriais, e em condições controle (25°C e 0,03% CO₂). Nesse caso, a cepa foi tolerante às condições testadas mostrando-se uma boa candidata a espécie sequestradora de CO₂. Em relação a composição da biomassa, esses mesmos autores verificaram que as condições de maior temperatura e CO₂ proporcionaram maior produtividade, mas redução nas proporções de carbono, hidrogênio e nitrogênio, bem como em

proteínas, carboidratos e carotenóides, porém maior conteúdo em lipídeos (Tabela 10). Os valores de CHN verificados na condição controle foram similares aos encontrados no presente trabalho na condição com CO₂. Em relação às proteínas, os valores encontrados no presente trabalho, independente do tratamento, foram menores aos verificados por Basu et al. (2013). Já em relação aos lipídeos, os teores na condição controle daquele trabalho foram similares aos aqui verificados na condição com CO₂; e os verificados na condição de alta temperatura e CO₂ foram cerca de 10% superiores. Como os autores concluíram, *S. obliquus* é um excelente candidato para remoção de CO₂ de gases residuais em sistemas de cultivo de bancada, possivelmente essa capacidade seja otimizada em cultivo realizado com essas concentração de CO₂ em sistema do tipo HAPS.

Tabela 10 - Análise elementar e bioquímica de *S. obliquus* SA1 (dados médios ± desvio-padrão).

Propriedades		com CO ₂	sem CO ₂	Presente trabalho	
				C/CO ₂	S/CO ₂
Conteúdo elementar (%)	Carbono	44,43	48,20	49,28	47,59
	Hidrogênio	6,40	7,08	7,47	7,58
	Nitrogênio	5,74	6,67	7,30	3,83
Perfil Bioquímico (% biomassa seca)	Carboidratos totais	30,87 ± 0,64	39,77 ± 0,67	nd*	nd*
	Proteínas totais	9,48 ± 1,65	12,92 ± 0,78	8,41	5,79
	Lipídios totais	33,04 ± 0,46	23,44 ± 1,08	20,84	15,44
	Clorofilas totais	6,03 ± 0,19	4,92 ± 0,37	nd*	nd*
	Carotenoides	0,02 ± 0,005	0,06 ± 0,02	nd*	nd*

Fonte: Adaptado de Basu et al. (2013).

Em outro trabalho, HO e colaboradores (2013), trabalhando com uma cepa de *S. obliquus* CNW-N avaliaram a influência da privação do fornecimento de nitrogênio quanto à produtividade e ao conteúdo celular de carboidratos lipídios e proteínas com aporte de CO₂. Os autores verificaram a diminuição do teor de proteínas e aumento de carboidratos e lipídios em resposta ao aumento do tempo sem a presença de nitrogênio no meio, bem como a produtividade se mostrou superior. O estresse pela deficiência de nitrogênio direcionou as vias metabólicas

para a produção de moléculas energéticas a partir de carboidratos e lipídios (Tabela 11).

Tabela 11 - Desempenho de *S. obliquus* CNW-N sob diferentes regimes de privação de nitrogênio (N) quanto à produtividade (g L^{-1}) e conteúdo celular (%) com aporte de CO_2 (2,5%; fluxo de 0,4 vvm; intensidade luminosa de $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Adaptado de HO et al.(2013).

Tempo de cultivo (dias) sob privação de Nitrogênio (N)	Produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Conteúdo celular (biomassa seca) (%)		
		Carboidratos	Lipídios totais	Proteínas
Ctrl (N todo tempo)	0,366 ±18,9	20,9 ±1,73	7,67 ±0,98	50,43 ±1,88
0	0,489 ±26,4	27,07 ±1,77	7,91 ±1,58	49,02 ±1,39
1	0,573 ±25,7	38,81 ±2,03	8,94 ±1,99	35,48 ±2,05
2	0,554 ± 33,1	49,36 ±2,35	11,72 ±3,08	27,38 ±0,99
3	0,520 ±31,4	46,98 ±1,89	13,66 ±2,01	24,96 ±1,05
Presente trabalho*	0,234 ±0,05	nd**	20,84 ±1,21	9,73 ±1,61

Fonte: Adaptado de HO et al.(2013).

No presente trabalho, resguardadas as devidas proporções, o comportamento de *S. obliquus* apresentou tendências semelhantes, onde o aporte de CO_2 e a ausência de aporte de nitrogênio ao longo do tempo promoveu aumento do teor de lipídios, já o conteúdo proteico encontrado foi maior ao contrário do descrito pelos autores.

CAPÍTULO II – ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *Chlamydomonas acidophila* - LAFIC-004 EM CULTIVO COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO E ZINCO.

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo são apresentados os resultados relativos aos objetivos específicos da tese referentes ao ensaio ecofisiológico para aplicação em biotecnologia ambiental, que foram: a) Avaliar a cepa de microalga extremófila *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 quanto ao seu crescimento em meio contendo altas concentrações de metais (Zinco e Cádmio) semelhante ao ambiente de DAM; b) Analisar os níveis intracelulares de glutationas e fitoquelatinas de *C. acidophila* LAFIC-004 em meio com alta concentração de metais; c) Verificar as alterações da ultraestrutura celular de *C. acidophila* LAFIC-004 exposta a Zinco e Cádmio em altas concentrações. Os resultados obtidos neste capítulo contaram com a colaboração do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Algas do Instituto de Química da USP, do Laboratório de Instrumentação Analítica da UNISC, e do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

A cepa de *Chlamydomonas acidophila* - LAFIC-004 foi previamente isolada a partir de coletas de áreas impactadas por rejeitos piritosos de carvão mineral na no município de Siderópolis, em 2010. Desde então é cultivada em Meio MAM, conforme Olaveson & Stokes (1989), no Laboratório de Ficologia (LAFIC) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. As condições de cultivo padrão no cepário do LAFIC são: fotoperíodo de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância média de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Delineamento experimental

Para averiguar o potencial da cepa quanto à remoção de Cádmio e Zinco por *C. acidophila* LAFIC-004, o meio padrão (controle) foi acrescido de cádmio e zinco, individualmente, em duas concentrações, conforme a tabela 12. Os experimentos foram realizados com auxílio de mesa de agitação orbital (shaker). Os frascos foram vedados com filme

plástico e mantidos em bancada sob iluminação de luz branca (fluorescentes de 32 W, luz do dia, Osram) média de $50 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, por sete dias (168 horas), conforme a figura 32.

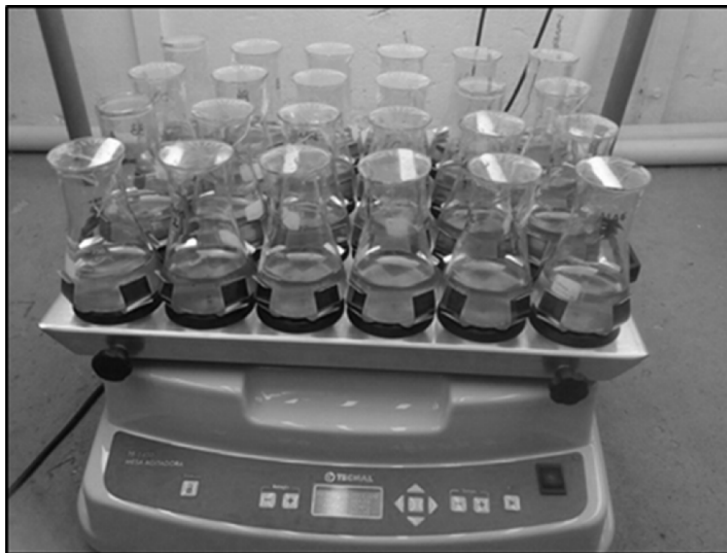
Tabela 12 - Tratamentos testados para avaliação da tolerância a metais pesados (cádmio e zinco) com suas respectivas concentrações.

Tratamento	Conc. do sal (g.L⁻¹)	Conc. de Zinco (μM)	Conc. de cádmio (μM)
A. MAM + ZnCl ₂	0,5	3600	-
B. MAM + CdCl ₂	0,01	-	54,4
C. MAM + ZnCl ₂ (A/2)	0,25	1830	-
D. MAM + CdCl ₂ (B/2)	0,005	-	27,3
E. MAM (controle)	-	0,77	-

Fonte: o autor.

Todos os tratamentos foram testados com 4 unidades experimentais, em Erlenmeyers com 180 mL de volume de cultivo, inoculados com 10mL de cultura em fase exponencial de crescimento, como densidade inicial média de 45×10^4 células mL⁻¹. O cultivo em pH 3,6 foi adotado como controle, em função deste ser o pH padrão do meio MAM. Foram coletadas alíquotas das unidades diariamente, fixadas em lugol para posterior contagem ao microscópio óptico.

Figura 32 - Agitador orbital, com iluminação artificial por lâmpadas fluorescentes de luz branca fria (32W), em sala climatizada à temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h para os experimentos com *C. acidophila* –LAFIC 004.



Fonte: o autor.

Determinações de pigmentos

A determinação das concentrações de pigmentos fotossintéticos (clorofila-a; clorofila-b e carotenoides) seguiu a metodologia descrita em Ritchie (2008). Foram separados 20 mL cultivo para filtragem em filtro de fibra de vidro de 25 mm de diâmetro e $0,7 \mu\text{m}$ de porosidade. Todo o processo foi realizado em ambiente escurecido para minimizar a degradação dos pigmentos na amostra pela luz ambiente. Os filtros foram guardados em tubos de ensaio de vidro com 10 mL de solvente (acetona 90%), embrulhados com alumínio e estocados em freezer (-12°C) por 24h. Após este período os tubos foram centrifugados para a leitura da densidade óptica do sobrenadante (contendo o extrato de pigmentos) em espectrofotômetro (Femto modelo 600 plus) nos comprimentos de onda de 480, 510, 630, 647, 664 e 750 nm. O extrato puro de acetona 90% foi usado como prova em branco. O resultado foi expresso em $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme as fórmulas abaixo, onde A indica a absorbância lida no respectivo comprimento de onda:

Clorofila-a (16)

$$(\mu\text{g L}^{-1}) = \{[11,85 \times (A_{664_{nm}} - A_{750_{nm}})] - [1,54 \times (A_{647_{nm}} - A_{750_{nm}})] - [0,08 \times (A_{630_{nm}} - A_{750_{nm}})]\} \times 1000$$

Clorofila-b (17)

$$(\mu\text{g L}^{-1}) = \{[21,03 \times (A_{647_{nm}} - A_{750_{nm}})] - [5,43 \times (A_{664_{nm}} - A_{750_{nm}})] - [2,66 \times (A_{630_{nm}} - A_{750_{nm}})]\} \times 1000$$

Carotenoides (18)

$$(\mu\text{g L}^{-1}) = [7,6 (A_{480_{nm}} - A_{750_{nm}}) - 1,49 (A_{510_{nm}} - A_{750_{nm}})]$$

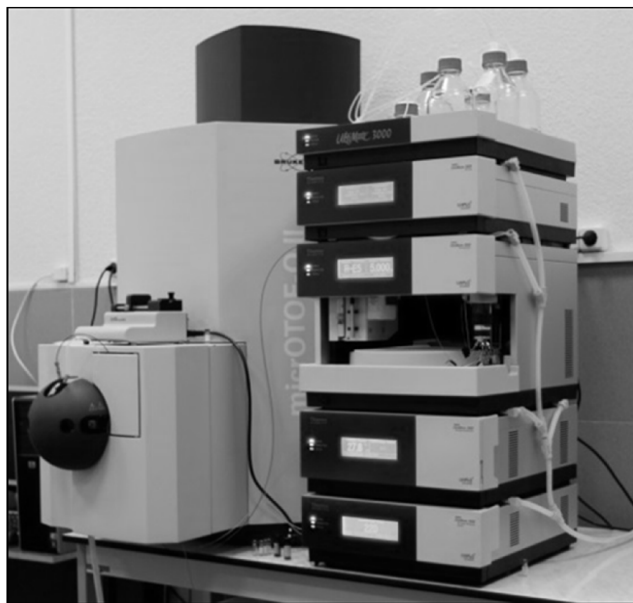
Análise de Fitoquelatinas e Glutationas

Para verificação da existência de mecanismo de detoxificação celular foi realizada a análise de fitoquelatinas e glutacionas para os tratamentos delineados, conforme método desenvolvido e adaptado pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo- USP. O método quantifica Fitoquelatinas e Glutationas na forma livre.

Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados 940 μL de N-etilmaleimida (NEM) 10 mM, utilizado para derivatizar GSH visto que seu grupamento tiol se oxida rapidamente, e 60 μL do dipeptídeo γ -glutamil-glutamato (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentração final no ensaio foi de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), utilizado como padrão interno. As células foram rompidas utilizando-se beads de metal em um triturador de tecidos por 5 minutos numa frequência de 20 Hz. Após este período, a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 12000 g à 4°C e 500 μL do sobrenadante foram transferidos para um tubo contendo 750 μL de clorofórmio. Ao tubo contendo clorofórmio mais a amostra, foram adicionados 500 μL de água e o conteúdo foi homogeneizado em vortex, seguido por um novo passo de centrifugação durante 5 minutos à 12000 g e a 4°C. A fase superior, aquosa, foi coletada e separada em HPLC (Figura 33) acoplado ao espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS). O método de separação consistiu na utilização de uma coluna C18 (3 μm ,

150 x 2 mm, Luna, Phenomenex), com volume de injeção de amostra de 10 μL , fluxo 0,25 mL min^{-1} , gradiente binário [A – água + ácido fórmico 0,1%, e 5 mM de acetato de amônio; B – Acetonitrila]: 0 – 1 min, 0% de B; 1 – 3 min, 70% de B; 3 – 3,5 min 70%; 3,5 – 5, 0%; 5 – 16 min 0% de B (etapa de reequilíbrio da coluna). Os tempos de retenção de $\gamma\text{-Glu-Glu}$, GSSG e GSH (como este foi derivatizado, a massa rastreada foi a soma de GSH+NEM+1, sendo 01 referente a ionização positiva referente a 01 próton) foram respectivamente, 1,8; 6,7 e 6,9 minutos. Todo o processo foi repetido para cada unidade experimental. Para identificação e quantificação dos compostos, foi utilizado fragmentação (MS/MS) no modo monitoramento de reação múltipla (MRM) e GSH e GSSH foram normalizados pelo padrão interno ($\gamma\text{-Glu-Glu}$). As curvas de calibração do método apresentaram-se lineares no intervalo de 50 – 2500 ng mL^{-1} .

Figura 33 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Espectrômetro de Massas (HPLC-MS/MS microOTOF-QII) da USP utilizado nas determinações de fitoquelatinas e glutatonas de *C.acidophila*.



Fonte: o autor.

Análise ultra-estrutural das células de *C. acidophila* LAFIC-004

Para verificar o destino e os efeitos dos metais na ultra-estrutura das células da espécie estudada, amostras da microalga foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Ao final dos cultivos experimentais as células foram recuperadas por centrifugação e fixadas conforme Silva (2011). A biomassa recuperada na centrifugação foi imersa em solução de glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1% por duas horas em refrigeração. Fixadas, as amostras foram centrifugadas por 20 min. a 3.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram lavados com tampão fosfato 0,1 M e deixados em repouso por 20 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min. O procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes e aos pellets foi adicionado ágar a 2% para facilitar a manipulação da amostra. O ágar forma um bloco que é facilmente removido do microtubo e os pellets podem ser recuperados totalmente. O excesso de ágar foi descartado e os blocos contendo a amostra foram colocados em novos tubos onde foram pós fixados com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% e mantidos em refrigeração por 24 horas. Após esse período, o OsO_4 foi descartado e foram realizadas 2 lavagens com tampão fosfato e uma última com água destilada.

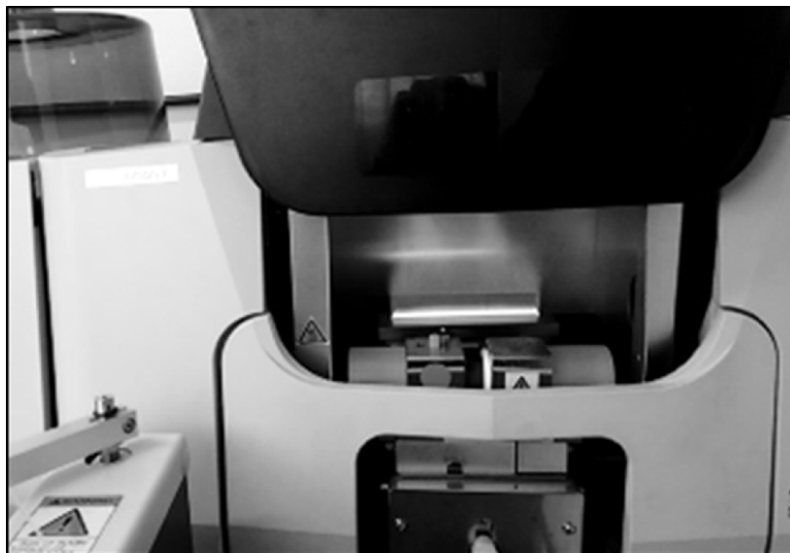
Em seguida foi feita a desidratação dos pellets, realizada com lavagens de solução de acetona em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90, 100 - duas vezes) por 20 minutos em cada concentração. Uma vez desidratados, os pellets foram infiltrados em resina, através de tratamentos sucessivos com concentração crescente, diluída em acetona (acetona: resina; 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e por fim resina pura por duas vezes). O tempo médio de tratamento com essas concentrações de resina foi de 12 horas. Por fim, foi feita a polimerização das amostras (pellets) por manutenção das mesmas em resina pura por 24 horas. Após esse processamento as amostras puderam ser armazenadas para a realização de cortes em micrótomo e posterior análise ao microscópio eletrônico. As imagens foram obtidas através de um Microscópio de Transmissão Eletrônica JEM 1011, junto ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

Quantificação de Cádmio e Zinco no sobrenadante do cultivo de *C. acidophila* - LAFIC-004

Com vistas a quantificar as quantidades de Cádmio e Zinco remanescentes no sobrenadante centrifugado ao final do cultivo de

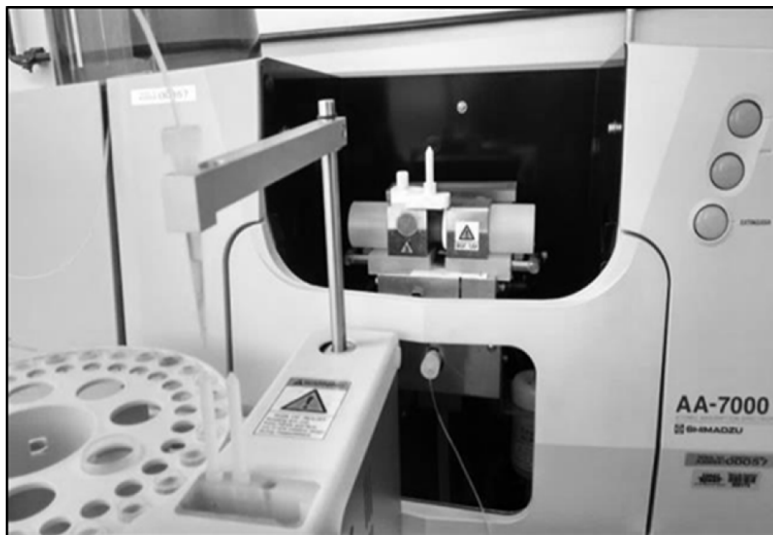
C.acidophila LAFIC-004 foram feitas determinações analíticas através de Espectrometria de Absorção Atômica (EAA) e Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (EAA-FG). As análises foram feitas em espectrômetro, modelos AA-7000 e GFA-7000 Shimadzu, seguindo a metodologia SMEWW 3111b e 3113b do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (EATON et al., 2012) para determinação de metais em chama e em forno de grafite, respectivamente. Estas análises foram feitas no Laboratório de Instrumentação Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC (Figuras 34 e 35).

Figura 34 - Espectrômetro de Absorção Atômica (EAA) no Laboratório de Instrumentação Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.



Fonte: o autor.

Figura 35 - Absorção Atômica (EAA) com Forno de Grafite (EAA-FG), no Laboratório de Instrumentação Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.



Fonte: o autor.

Como as amostras apresentavam elevada acidez naturalmente, não foi necessário realizar o preparo prévio de acidificação das amostras para proceder à leitura. A curva de calibração foi preparada com padrões conhecidos do respectivo elemento com um coeficiente de regressão superior a 0,99 conforme as equações 19 e 20.

Curva de calibração para o Zinco (19)

$$y = 0,16832x + 0,050940$$
$$r = 0,9983$$

Curva de calibração para o Cádmiu (20)

$$y = 0,15160x + 0,0029381$$
$$r = 0,9995$$

Não foram utilizadas concentrações de padrões que proporcionaram absorbâncias maiores que 0,8. Em função da sensibilidade do método em relação às concentrações das amostras, foi

utilizado em seguida o método de espectroscopia em forno de grafite (maior sensibilidade). Um volume de 20 μ L da amostra preparada conforme descrito acima foi aplicado no tubo de grafite para leitura e determinação das quantidades traço.

Análise Estatística

Os experimentos foram reproduzidos três vezes, em datas distintas, constituídos por seis tratamentos e quatro unidades experimentais por tratamento. Para comparar as médias de densidade celular, incremento de biomassa, pH, pigmentos (clorofila-a; clorofila-b; carotenoides) e concentração do metal no sobrenadante entre os tratamentos, utilizou-se primeiramente o teste de Cochran para identificação e eliminação de outliers e em seguida foi aplicada a Análise da Variância (ANOVA fatorial) com teste posterior, se necessário. Todas as análises foram realizadas no software estatístico STATISTICA v.10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento celular e pH

Quanto ao Zinco, todos os tratamentos testados apresentaram crescimento significativo tanto em número de células como em biomassa. Conforme a tabela 13, a análise da variância revelou apenas o fator tempo como fonte de variação dos dados para a DC, onde a média final ($328,3 \times 10^4 \pm 59,3$ células mL⁻¹) foi maior que a inicial ($40,5 \times 10^4 \pm 17,7$ células mL⁻¹). A biomassa seguiu a mesma tendência, com uma média final de $0,148 \pm 0,05$ gL⁻¹, cerca de cinco vezes maior que a média inicial de $0,03 \times 10^4 \pm 0,009$ células mL⁻¹. Estes resultados apontaram para uma alta tolerância da cepa às altas concentrações de Zinco testadas.

Tabela 13 - Análise da variância (ANOVA fatorial) dos dados de crescimento e pH para *C. acidophila* LAFIC-004 nos tratamentos com zinco. Onde: Gl = Graus de liberdade; F = valor do teste F; *p* = probabilidade calculada; DC = Densidade celular (células mL⁻¹); BIOM = Biomassa (g L⁻¹). Valores em negrito representam diferença significativa (*p* < 0,05).

Fontes de Variação	Gl	DC		BIOM		pH	
		F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Tratamento	2	2,3834	0,1046	0,5564	0,5774	0,27	0,7677
Tempo	1	587,520	0,001	107,2414	0,0001	308,3	0,0001
Tratamento x Tempo	2	2,2282	0,1203	0,4945	0,6134	1,37	0,2658

Fonte: o autor.

O pH sofreu redução ao longo do tempo, sendo a média final de $3,04 \pm 0,05$ significativamente menor que a inicial $3,14 \pm 0,11$. Uma vez que não houve correção do pH durante o experimento, era esperado um aumento do pH em função da atividade fotossintética, porém esta hipótese não se confirmou. Contudo, a alta concentração de Zn^{2+} nos tratamentos não contribuiu para esta variação do pH.

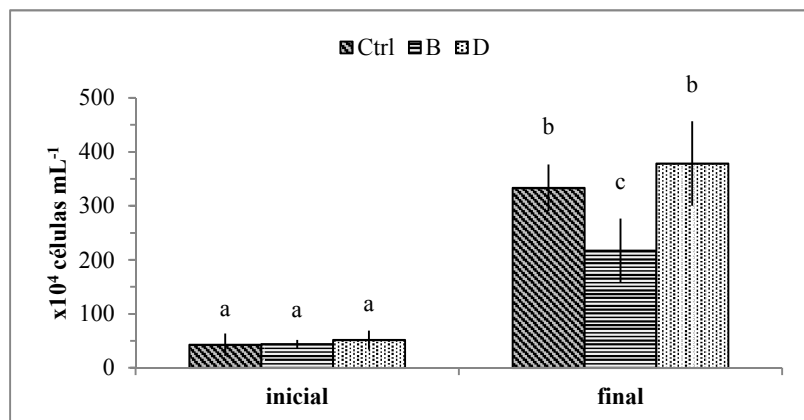
Em relação ao tratamento com Cádmio, a análise da variância revelou um padrão diferente, onde a DC foi influenciada pela interação entre tempo e a presença de metais (tratamento) conforme a tabela 14. Houve crescimento em todos os tratamentos, porém o tratamento B teve seu crescimento reduzido significativamente em relação ao controle e ao tratamento D, conforme a figura 36. Nota-se a grande capacidade da cepa de *C. acidophila* LAFIC-004 regular seu metabolismo frente às altas concentrações de Cádmio testadas, que proporcionam um ambiente de estresse oxidativo, mesmo assim, em especial o tratamento D, apresentou crescimento semelhante ao controle ($378,3 \times 10^4 \pm 78,3$ células mL⁻¹ e $333,3 \times 10^4 \pm 43,2$ células mL⁻¹, respectivamente).

Tabela 14 - Análise da variância (ANOVA fatorial) dos dados de crescimento e pH para *C. acidophila* LAFIC-004 nos tratamentos com cádmio. Onde: GI = Graus de liberdade; F = valor do teste F; p = probabilidade calculada; DC = Densidade celular (células mL⁻¹); BIOM = Biomassa (g L⁻¹). Valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05).

Fontes de Variação	GI	DC		BIOM		pH	
		F	p	F	p	F	p
Tratamento	2	14,46	<0,001	1,59	0,214	0,4	0,665
Tempo	1	405,72	<0,0001	119,4	<0,001	481,6	<0,001
Tratamento x Tempo	2	12,62	<0,0001	1,45	0,244	1,8	0,173

Fonte: o autor.

Figura 36 - Densidade celular inicial e final de *C. acidophila* LAFIC-004, em duas concentrações de cádmio. Onde: Ctrl = tratamento controle (meio MAM); B = tratamento com Cádmio [54,4µM de Cd²⁺]; D = tratamento com Cádmio [27,3µM de Cd²⁺]. As barras representam as médias das repetições (excluídos os valores outliers). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa (p<0,05).



Fonte: o autor.

A análise da variância para a biomassa revelou a influência apenas do tempo sobre o crescimento (Tabela 14), onde o valor médio

final foi de $0,140 \pm 0,0222 \text{ gL}^{-1}$, partindo de $0,026 \pm 0,0017 \text{ gL}^{-1}$ inicialmente. O pH nos tratamentos com cádmio apresentou o mesmo padrão de variação dos tratamentos com zinco, sofrendo redução significativa ao longo do tempo (de $3,49 \pm 0,07$ para $3,04 \pm 0,04$), porém não foi influenciado pelas concentrações do metal na variância dos dados. Diante do crescimento observado nos tratamentos com cádmio em relação ao controle, esta redução de pH pode estar indicando redução da quantidade de metal no meio (absorção celular).

Quantificação de Cádmio e Zinco no sobrenadante do cultivo de *C. acidophila* - LAFIC-004

Em relação à determinação das concentrações de metais remanescentes no meio ao final do cultivo (sobrenadante), primeiramente quanto ao zinco, a análise da variância revelou a influência dos tratamentos como fonte de variação (Tabela 15), não havendo, portanto diferença significativa quanto à absorção promovida pelas células entre os tempos iniciais em A ($2682,34 \pm 39,12 \mu\text{M}$ de Zn^{2+}) e C ($1338,71 \pm 24,8 \mu\text{M}$ de Zn^{2+}) e seus respectivos tempos finais ($2657,73 \pm 43,88$ e $1347,66 \pm 23,72 \mu\text{M}$ de Zn^{2+}).

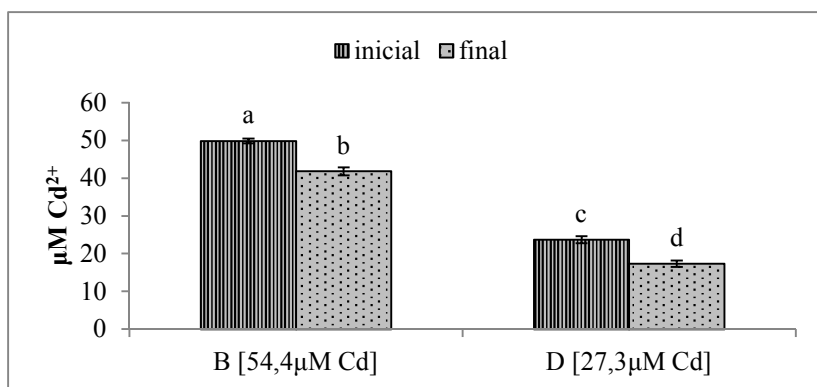
Tabela 15 - Análise da variância (ANOVA fatorial) para as concentrações de metais (zinco e cádmio, inicial e final) no sobrenadante do cultivo de *C. acidophila* LAFIC-004. Onde: GI = grau de liberdade; F = valor do teste F; p = valor da probabilidade calculada. Valores em negrito representam diferença significativa ($p < 0,05$).

ZINCO			
	GI	F	<i>p</i>
TRATAMENTO	2	41563,55	<0,0001
TEMPO	1	2,072122	0,1574
TRATAMENTO x TEMPO	2	0,779892	0,4650
CÁDMIO			
	GI	F	<i>p</i>
TRATAMENTO	2	16469,67	<0,0001
TEMPO	1	536,0649	<0,0001
TRATAMENTO x TEMPO	2	139,5126	<0,0001

Fonte: o autor.

Para o cádmio, a análise da variância revelou a interação entre as concentrações testadas e o tempo, como fonte de variação dos dados. Nos dois tratamentos houve redução significativa da concentração de cádmio ao final do experimento (Figura 37).

Figura 37 - Concentração de cádmio no sobrenadante do cultivo de *C. acidophila* LAFIC-004. Onde: B = tratamento com 54,4 μ M de cádmio; D = tratamento com 27,3 μ M de cádmio. As barras representam a média (com seus respectivos desvios-padrão) dos valores de absorção atômica para cada tratamento, no tempo 0h (inicial) e no tempo 168h (final) ao término do período experimental; letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

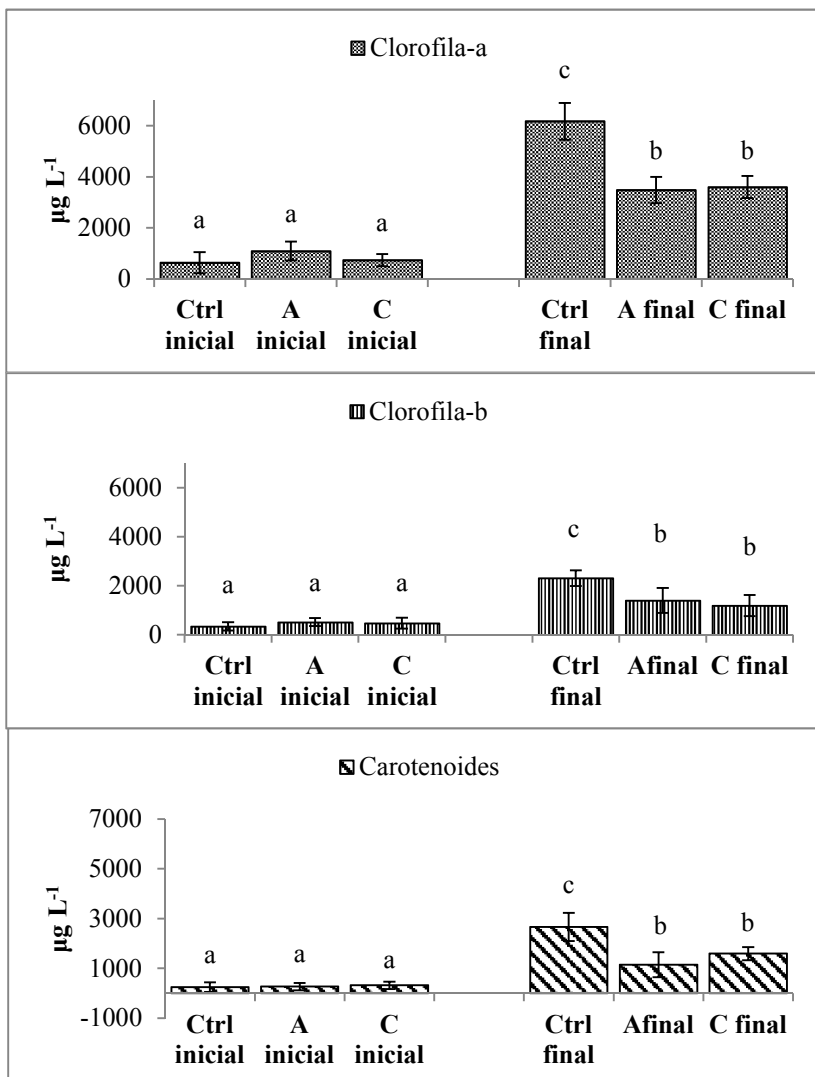
Pigmentos fotossintéticos

Quanto aos pigmentos fotossintéticos para ambos os metais houve influência dos tratamentos ao longo do tempo em relação ao controle, para clorofila-a, clorofila-b e carotenoides (Tabela 16). No caso do zinco houve redução significativa dos três pigmentos em relação ao controle, mas não houve diferença significativa das médias entre as concentrações de zinco testadas, revelando a tolerância da cepa à condição estressante imposta (Figura 38).

Tabela 16 - Análise da variância (ANOVA fatorial) da concentração de pigmentos fotossintéticos de *C.acidophila* LAFIC-004. Onde: GI = Graus de liberdade; Clor-a = concentração de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$); Clor-b concentração de clorofila-b ($\mu\text{g L}^{-1}$); Carot = concentração de carotenoides ($\mu\text{g L}^{-1}$); F = valor do teste F; p = probabilidade calculada. Valores em negrito representam diferença significativa ($p < 0,05$).

	G	Clor-a	Clor-a	Clor-b	Clor-b	Carot	Carot
ZINCO	1	F	p	F	p	F	p
TRATAMENTO	2	33,52	<0,001	2,30	0,1120 5	19,13	<0,001
TEMPO	1	695,86	<0,01	36,63	<0,001	229,54	<0,001
TRATAMENTO x TEMPO	2	51,68	<0,001	3,97	<0,001	20,93	<0,001
CÁDMIO							
TRATAMENTO	2	13,88	<0,001	0,36	0,69	3,54	<0,001
TEMPO	1	486,57	<0,001	255,50	<0,001	310,66	<0,001
TRATAMENTO x TEMPO	2	13,42	<0,001	1,20	<0,001	3,69	<0,001

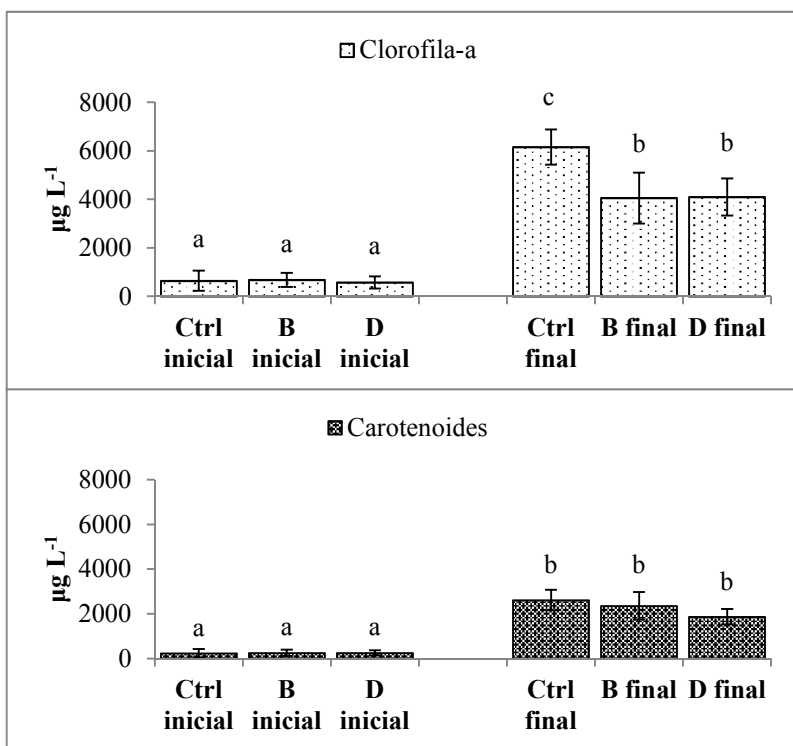
Figura 38- Concentrações de pigmentos fotossintetizantes (clorofila-s, clorofila-b e carotenoides) de *C.acidophila* – LAFIC-004 nos tratamentos com zinco. Onde: Ctrl = tratamento controle; A = tratamento A com $3600\mu\text{M}$ de Zn^{2+} ; C = tratamento C com $1830\mu\text{M}$ de Zn^{2+} . As barras representam as médias (com seus respectivos desvios-padrão); letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

Para o cádmio, a análise da variância revelou que a clorofila-b teve aumento significativo ao longo do tempo, porém não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e o controle, aumentando em média de $406,68 \pm 113,15$ para $2426,32 \pm 157,43 \mu\text{g L}^{-1}$. A clorofila-a e os carotenoides apresentaram a mesma tendência evidenciada nos tratamentos com zinco, onde houve aumento significativo em todos os tratamentos, porém o controle teve a maior média (Figura 39). Novamente foi possível observar a tolerância desta cepa quanto a metais em alta concentração, nesse caso o cádmio.

Figura 39 - Concentrações de pigmentos fotossintetizantes (clorofila-s, clorofila-b e carotenoides) de *C.acidophila* – LAFIC-004 nos tratamentos com cádmio. Onde: Ctrl = tratamento controle; B = tratamento B com $54,4\mu\text{M}$ de Cd^{2+} ; C = tratamento C com $27,3\mu\text{M}$ de Cd^{2+} . As barras representam as médias (com seus respectivos desvios-padrão); letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

Glutationas e Fitoquelatinas em *C. acidophila* LAFIC-004

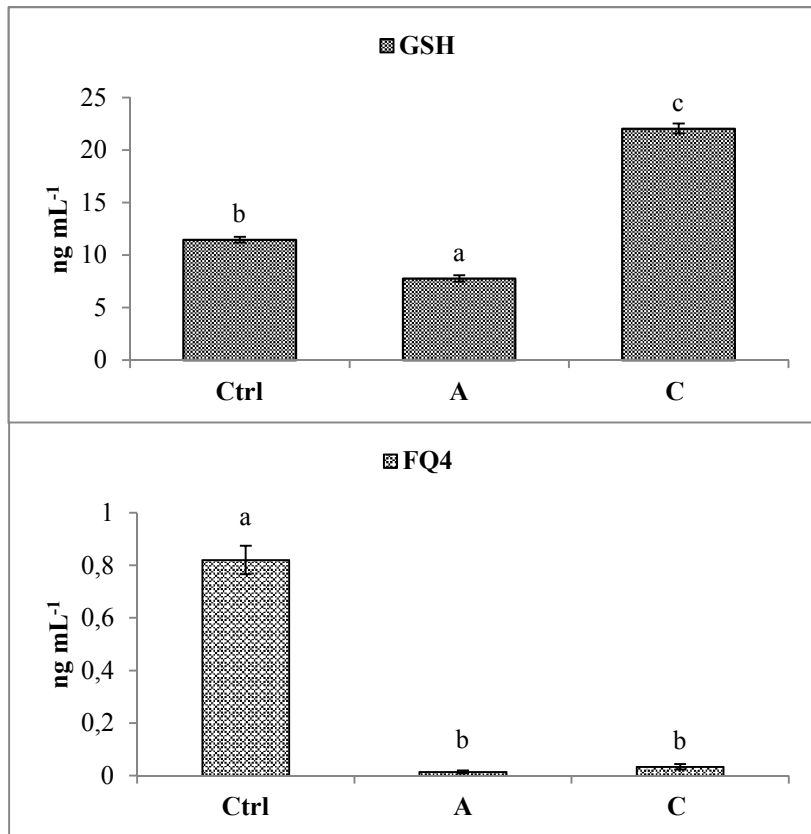
Em relação às glutationas e fitoquelatinas, nos tratamentos com zinco primeiramente, a análise da variância revelou influência significativa das concentrações do metal sobre as médias de glutationas reduzidas (GSH), conforme a tabela 17. O tratamento C apresentou a maior quantidade de glutationas em sua forma reduzida, e no tratamento A houve a menor quantidade entre os tratamentos (Figura 40). As médias de glutationas oxidadas (GSSG) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, apresentando em média $0,029 \pm 0,005$ ng mL⁻¹.

Tabela 17 – Análise da variância (ANOVA unifatorial) das médias de glutationas e fitoquelatinas de *C.acidophila* LAFIC-004. Onde: Gl = graus de liberdade; F = valor do teste F; p = valor da probabilidade calculada ($p < 0,05$); GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada. FQ4 = Fitoquelatina tipo 4.

	G l	GSH		GSSG		FQ4	
		F	P	F	p	F	p
Zinco	2	120,79 1	<0,01	2,170	0,149	1253,86	<0,001
Cádmio	2	10,859	<0,01	3713,6	<0,01	630,346	<0,001

Fonte: o autor.

Figura 40 - Médias de glutationas reduzidas (GSH) e fitoquelatinas (FQ4) de *C.acidophila* LAFIC-004 entre os tratamentos com zinco. Onde: GSH = glutationa reduzida; FQ4 = Fitoquelatina do tipo 4; Ctrl = tratamento controle; A = tratamento com zinco (3600 μ M de Zn²⁺); C = tratamento com zinco (1830 μ M de Zn²⁺). As barras representam as médias (e seus respectivos desvios-padrão) para cada tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

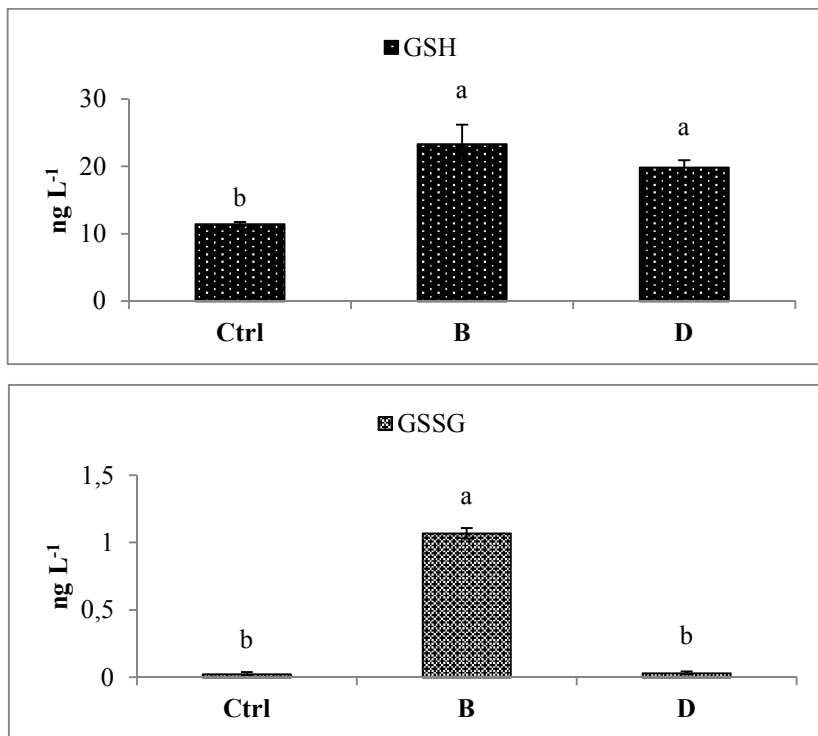


Fonte: o autor.

Quanto às fitoquelatinas nos tratamentos com zinco, apenas no controle houve a ocorrência de fitoquelatinas do tipo 3 (FQ3), com média de $17,494 \pm 0,146$ ngL⁻¹. A análise da variância revelou diferença significativa entre os tratamentos quanto ao controle que apresentou a maior concentração de FQ4 (Figura 40).

Em relação aos tratamentos com cádmio, a análise da variância revelou diferenças entre os tratamentos testados para GSH, GSSG e FQ4 (tabela 17). O tratamento controle apresentou a menor quantidade de GSH, não havendo diferença significativa entre os tratamentos B e D. Por outro lado, o tratamento B teve a maior quantidade de GSSG, não havendo diferença entre D e o controle (Figura 41). Quanto à FQ3, tal qual nos experimentos com zinco, somente no controle esta foi encontrada, com média de $17,480 \pm 0,13 \text{ ng L}^{-1}$. Já a FQ4 foi encontrada no controle e no tratamento D, porém sem diferença entre as médias, com $0,819 \pm 0,053 \text{ ngL}^{-1}$ para o controle e $0,783 \pm 0,057$ para o tratamento D.

Figura 41 - Médias de glutations reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG) de *C.acidophila* LAFIC-004 entre os tratamentos com cádmio. Onde: GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada; Ctrl = tratamento controle; B = tratamento com cádmio (54,4 μM de Zn^{2+}); D = tratamento com cádmio (27,3 μM de Zn^{2+}). As barras representam as médias (e seus respectivos desvios-padrão) para cada tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: o autor.

Alterações ultraestruturais de *C.acidophila* LAFIC-004

O cultivo de *C. acidophila* LAFIC-004 em Zinco e Cádmio nas concentrações testadas proporcionou alterações na morfologia das células, nitidamente visíveis nas observações da ultraestrutura celular, através da microscopia eletrônica de transmissão. Em todas as concentrações testadas em ambos os tratamentos houve alteração na distribuição dos grãos de amido ao redor do pirenoide e também na

quantidade de vacúolos (Figura 42). Em relação ao Zinco, apenas na maior concentração testada (tratamento A) houve nítida alteração morfológica dos cloroplastos (Figura 42, quadro superior, imagens “i”, “j” e “k”). Para o tratamento com cádmio houve notadamente a formação de estruturas eletro-densas em diversas regiões da célula e nítida alteração de quantidade e distribuição dos grãos de amido em relação ao controle (Figura 42, quadro inferior, imagens “f”, “g”, “h” e “i”).

Figura 42 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *C. acidophila* LAFIC-004 cultivada em Zinco (quadro superior; imagens de “e” a “h” com ZnCl_2 [$2,5 \text{ g L}^{-1}$] referentes ao tratamento C; imagens de “i” a “l” com ZnCl_2 [$5,0 \text{ g L}^{-1}$] referentes ao tratamento A), e Cádmio (quadro inferior; imagens de “d” a “f” com CdCl_2 [$0,005 \text{ g L}^{-1}$] referentes ao tratamento D; imagens de “g” a “i” com CdCl_2 [$0,01 \text{ g L}^{-1}$] referentes ao tratamento B) em relação ao controle (quadro superior, imagens de “a” a “d”; quadro inferior de “a” a “c”). Onde: c = cloroplasto; N = núcleo; Pm = periplasma; Py = pirenoide; S = amido; V = vacúolo).

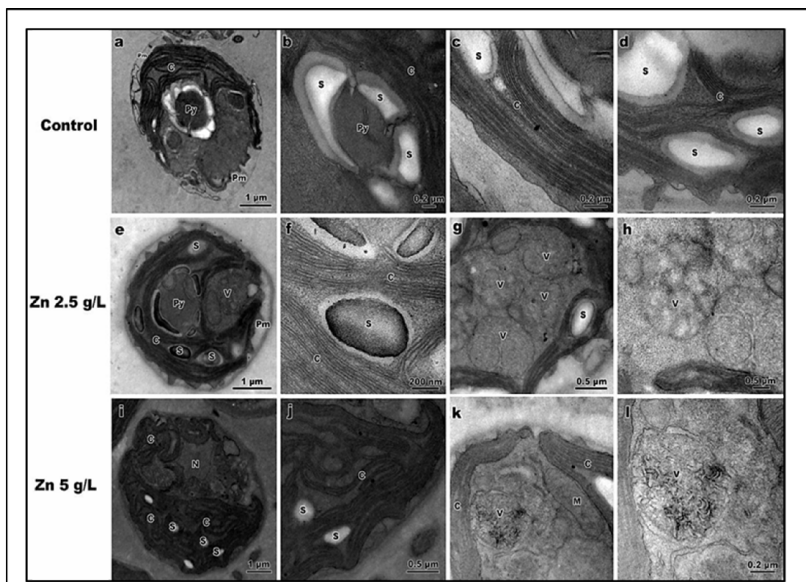
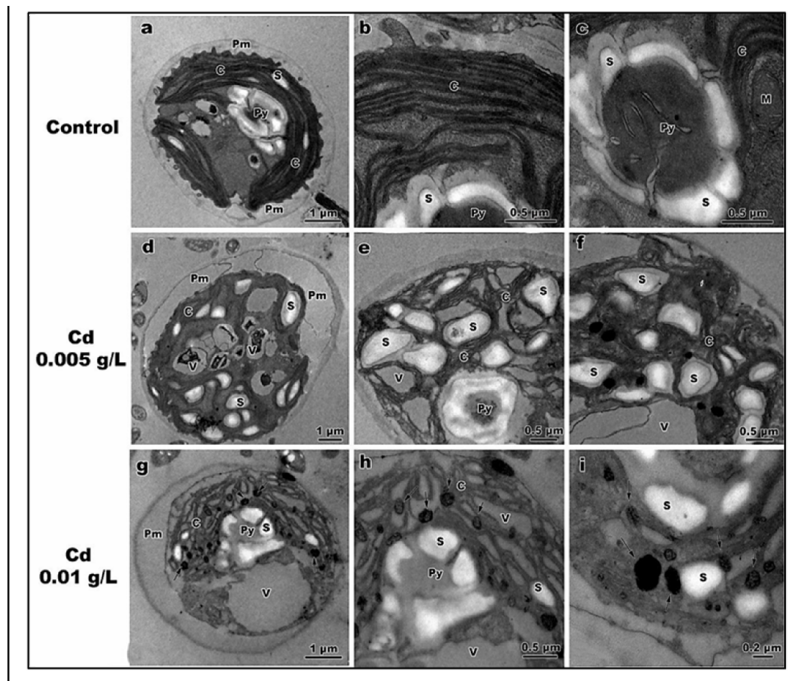


Figura 42 (continuação).



Fonte: o autor.

De um modo geral a cepa *C.acidophila* LAFIC-004 apresentou alta tolerância às concentrações de metais testadas. Quanto ao zinco, todos os tratamentos apresentaram crescimento ao longo do tempo. Isso se deve consideravelmente à relação entre este metal e as glutationas. O zinco atua na coordenação da formação de pontes dissulfeto das glutationas durante a catálise e com isso a passagem do estado oxidado para o reduzido novamente. Em geral, o Zinco atua como um micronutriente e é tolerado em quantidades relativamente grandes nos vegetais, porém em excesso torna-se tóxico e assim inativa as glutationas por impedir a coordenação do processo de oxi-redução (RAVEN; EVANS; KORB, 1999). Foi possível observar a influência da concentração testada no tratamento A em relação ao tratamento controle em termos de tentativa de controle da homeostase celular pela diminuição de um estresse oxidativo. Como esperado (em termos de estresse oxidativo), na comparação das médias houve redução significativa da quantidade de GSH no tratamento, contudo sem aumento significativo da GSSG (oxidação).

Ao se observar as médias de FQ ocorreu uma redução significativa de FQ4 no tratamento A, e até mesmo a ausência de FQ3 no mesmo. Dado que o método quantifica a forma livre de FQ, esta redução indica a complexação destas FQ com os íons do metal, tornando-as indisponíveis em sua forma livre. Isso constitui o indicativo do mecanismo (ou uma das estratégias) adotado pela cepa para balancear o equilíbrio iônico dentro da célula e manter a homeostase, corroborado pelo crescimento celular e em biomassa apresentados. Para o tratamento C e as FQ, a concentração testada apresentou maior quantidade de GSH, indicando um maior controle da homeostase nesta concentração de Zinco, visto que este metal tem papel importante no retorno do estado oxidado para o reduzido e é tolerado em grandes quantidades, sendo um importante cofator enzimático de diversos processos celulares em microalgas (MONTEIRO et al., 2011; RAVEN; EVANS; KORB, 1999).

A comparação entre os tratamentos A e C indica toxicidade da concentração de A aparentemente, mas ao se considerar o crescimento celular entre estes tratamentos (não diferiram entre si nem quanto ao controle) e as quantidades do metal encontradas no sobrenadante é possível notar grande tolerância desta cepa ao Zinco. Além disso, outro indicativo fica por conta dos pigmentos, onde a redução significativa no tratamento A em relação ao controle também não comprometeu o crescimento da cepa. A quantificação do zinco presente no sobrenadante ao final do cultivo de *C.acidophila* foi mais um indicativo da alta tolerância desta cepa a altas concentrações de Zinco no meio, visto que ao longo do tempo de exposição não houve diferença entre as quantidades absorvidas do metal, por outro lado a grande concentração do tratamento A, por exemplo, pode ser controlada do lado externo a célula, possibilitando sua sobrevivência neste meio com alto gradiente protônico. Porém esta manutenção de equilíbrio iônico trouxe notáveis alterações ultraestruturais que corroboram o estresse oxidativo citado, com distribuição irregular dos grãos de amido ao redor do pirenoide e também na quantidade de vacúolos, assim como nítida alteração morfológica dos cloroplastos.

Quanto ao Cádmio, o tratamento B (com maior concentração do metal) houve significativa redução do crescimento (em número de células), porém em C já não ocorreu o mesmo em relação ao controle. Ao se observar a variância da biomassa, houve uma indicação de que a concentração de cádmio do tratamento B proporcionou uma condição de alto estresse para *C.acidophila* LAFIC-004. Não houve diferença entre as médias de biomassa entre as concentrações. A partir disso,

inicialmente haveria duas possibilidades: a) no tratamento B haveria maior número de células mais velhas (maiores, com mais massa) do que jovens, resultado da dificuldade de crescimento imposta pelo gradiente protônico extracelular (porém não foi quantificado neste trabalho o biovolume celular para uma possível confirmação desta hipótese); b) em B houve grande acúmulo intracelular de cádmio, que se somou à massa das células na quantificação da biomassa, indicando que ao lidar com a grande concentração de prótons a cepa possivelmente absorve uma grande quantidade dos íons de cádmio, como parte da estratégia de redução do estresse oxidativo. Houve aumento significativo na quantidade de glutatona reduzida e oxidada no tratamento B em relação ao controle e não foi possível detectar FQ livres em B.

O Cádmio é sabidamente o maior indutor da fitoquelatina sintase, a enzima responsável pela síntese das fitoquelatinas, peptídeos ricos em grupos tiol que atuam como quelantes dos íons livres do metal, auxiliando as glutatonas na inativação ou transformação do excesso de íons metálicos (e radicais livres) na célula e reduzindo a apoptose celular (GRILL; WINNACKER; ZENK, 1985; PERALES-VELA; PEÑA-CASTRO; CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2006; STEFFENS, 1990). Considerando os dados de crescimento, onde B foi significativamente menor que os demais tratamentos, estes resultados indicam uma possível saturação do sistema (ou das estratégias) de equilíbrio da homeostase celular de *C. acidophila*-LAFIC-004. Também houve redução significativa de clorofila-a em relação ao controle, porém sem distinção entre o teor de carotenoides totais. Possivelmente como uma estratégia metabólica de compensar o estresse oxidativo promovido pelo cádmio, uma vez que o metal pode bloquear a cadeia transportadora de elétrons e comprometer significativamente a formação de ATP, levando a célula à apoptose.

Ao se observar a quantidade de cádmio no sobrenadante, e a redução significativa nos tratamentos ao longo do tempo foi também um provável indicativo de bioissorção (acúmulo) do metal por *C. acidophila* LAFIC-004, passível de ser observado fisicamente através da microscopia eletrônica de transmissão. Devido à eletropositividade do Cádmio, este pode ocupar os mesmos sítios de ligação do Zinco mais rapidamente, porém sua liberação não ocorre da mesma forma. Com isso o estresse oxidativo é muito maior nas células expostas ao Cádmio, mesmo em pequenas quantidades, pois exige da célula um gasto energético muito maior para o retorno ao estado reduzido das glutatonas. (RODRIGUES et al., 2016; VOLESKY; HOLAN, 1995). No tratamento com a menor quantidade de Cádmio, (tratamento D),

porém esta ainda superior a diversos trabalhos (Quadro 1), *C. acidophila* LAFIC-004 apresentou tolerância superior ao limite para *Chlamydomonas reinhardtii* (Rojcková-Padtrová & Marsálec, 1999) e por *Chlamydomonas acidophila* (Nishikawa & Tominaga, 2001) por exemplo.

Quadro 1 - Exposição de diferentes microalgas aos metais Zinco e Cádmiio, seus respectivos tempos de exposição (em horas) e concentração de tolerância (em micromolar - μM) em relação ao presente estudo com duas concentrações de exposição (maior : menor).

Microalga	Metal	Tempo de exposição (h)	(μM)	Referência
<i>Chlamydomonas acidophila</i>	Zinco	72	1160,0	Nishikawa & Tominaga, 2001
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			13,45	Rojcková-Padtrová & Marsálec, 1999
<i>Scenedesmus quadricauda</i>			5,03	
<i>Scenedesmus subspicatus</i>			4,75	
<i>Chlorella kessleri</i>			14,0	
<i>Chlorella</i> sp.			1,4	Franklin et al., 2002
<i>Chlamydomonas acidophila</i> LAFIC-004		168	3600/1830	Presente Estudo
<i>Scenedesmus obliquus</i>	96	260	Monteiro et al., 2010	
<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>		74,5		
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Cádmiio		200	Aguilera & Amils, 2005
<i>Chlamydomonas acidophila</i>			14,37	Nishikawa & Tominaga, 2001
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			6,48	Schafer et al., 1994

<i>Chlorella sp.</i>		72	0,85	Franklin et al., 2002
<i>Scenedesmus subspicatus</i>			0,25	Schafer et al., 1994
<i>Chlamydomonas acidophila</i> LAFIC-004		168	54,4 / 27,3	Presente Estudo
<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>		96	17,0	Monteiro et al., 2010
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			1,80	Schafer et al., 1994

Fonte: Adaptado de Silva (2011).

Este fato também endossa a constatação feita a partir dos dados do sobrenadante e da ausência de fitoquelatinas livres no tratamento B em especial. Estas alterações em *C.acidophila* LAFIC-004 refletem padrões descritos na literatura quanto à exposição de microalgas a metais e os respectivos mecanismos intracelulares de detoxificação conhecidos, ou seja, a precipitação (ou imobilização) por ligantes, através de glutatonas, metalotioneínas e fitoquelatinas face ao estresse oxidativo, a formação de polifosfatos (polyphosphate bodies). É também muito comum o aumento do número de vacúolos, o que facilita ao indivíduo o controle apropriado do balanço da concentração citoplasmática dos íons de metais na célula e consequente neutralização do potencial tóxico (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

Trabalhando com *Chlamydomonas* sp. isolada de ambiente altamente acidificado no rio Tinto (Espanha), Aguilera e Amils (2005) relataram que a exposição ao cádmio levou a um grande número de vacúolos, aumento do periplasma e diminuição no volume do pirenoide. O mesmo foi verificado aparentemente em *C. acidophila* LAFIC-004 no presente trabalho, ainda que não tenha sido possível a quantificação e comparação estatística destes dados (tamanho e número de estruturas em relação ao controle).

5. CONCLUSÃO GERAL DA TESE

Ao término deste trabalho como um todo, foi possível atingir o objetivo central proposto, o desenvolvimento, testes iniciais e proteção da ideia básica central de um sistema híbrido para o cultivo de microalgas, dentro do contexto de biotecnologia ambiental. A biomassa de *S. obliquus* produzida no sistema proposto apresentou teores de pigmentos (luteína e betacaroteno) próximos à literatura, porém com destaque para o betacaroteno na presença de CO₂ somente. No capítulo 1, foram realizados os testes de batelada com a microalga teste *S. obliquus* para validação do sistema nas condições de cultivo definidas. A análise do crescimento e produtividade de *S. obliquus* em relação à presença e ausência de CO₂ suplementar no cultivo revelou médias próximas a trabalhos semelhantes na literatura, corroborando o potencial da cepa na validação do sistema proposto. A presença de CO₂, contudo, se mostrou indispensável para o sucesso da atividade. Foi avaliado o perfil da biomassa de *S. obliquus* quanto ao conteúdo de óleo, perfil de ácidos graxos, teor de luteína e betacaroteno. Quanto ao teor de óleo foi constatado que *S. obliquus* cultivada com CO₂ no sistema proposto apresentou um teor de 20%, próximo à média encontrada na literatura, que varia de 2 a 55% no gênero *Scenedesmus*. Quanto ao perfil do óleo, foi possível observar que nas condições propostas de cultivo *S. obliquus* apresentou maior quantidade de ácidos graxos insaturados, com destaque para a classe dos ácidos graxos com cadeia de 18 carbonos e pode ser explorada futuramente para fins de consumo nutricional.

No capítulo 2, foi possível avaliar a cepa de microalga extremófila *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 quanto ao seu crescimento em meio contendo altas concentrações de metais (Zinco e Cádmio), semelhante às concentrações encontradas em ambiente de DAM. Houve crescimento nas concentrações testadas em relação ao controle, sem diferenças, nos tratamentos com zinco, evidenciando alta tolerância a este metal em grande concentração (tóxica). Para o cádmio houve redução do crescimento na máxima concentração testada em relação ao controle, porém as médias ficaram próximas. Foi possível quantificar os níveis intracelulares de glutatonas e fitoquelatinas de *C. acidophila* LAFIC-004 em meio com alta concentração de metais (estresse oxidativo) e a verificar das alterações da ultraestrutura celular da cepa exposta aos metais em altas concentrações corroborou a atividade das fitoquelatinas na imobilização dos metais no interior da célula, como uma das formas de manter o equilíbrio iônico frente ao gradiente protônico imposto pelo meio. De forma geral, *C. acidophila*

LAFIC-004 apresentou grande tolerância a altas concentrações de cádmio e zinco, porém nas condições propostas a remoção destes metais do meio sobrenadante não foi significativa. Não foi possível avaliar a forma química em que estes metais se encontravam ao final do experimento, fato que representa grande importância ambiental em termos de biorremediação, uma vez que mesmo não havendo significativa acumulação dos metais dentro da célula, talvez a cepa possa promover a complexação dos mesmos e liberando-os novamente ao meio de cultivo, tornando os mesmos indisponíveis a outros organismos da cadeia trófica.

Estes capítulos servem de base para trabalhos futuros dentro da linha de pesquisa do Laboratório de Ficologia da UFSC, onde se poderá testar a cepa de *C. acidophila* LAFIC-004 no sistema híbrido de cultivo, mantido com DAM para fins de ficorremediação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, A.; AMILS, R. Tolerance to cadmium in sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 75, n. 4, p.316-329, 30 nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.002>.

ADEY, Walter H. et al. Algal turf scrubber (ATS) flowways on the Great Wicomico River, Chesapeake Bay: productivity, algal community structure, substrate and chemistry 1. **Journal Of Phycology**, [s.l.], v. 49, n. 3, p.489-501, 25 mar. 2013.

AMBONI, Mirlene Meis; ZANUZ, Márcio; GOMES, Cleber José Baldoni. QUANTIFICAÇÃO DAS ÁREAS MINERADAS EM SUBSOLO PELA MINERAÇÃO DE CARVÃO NO MUNICÍPIO DE CRICIÚMA – SANTA CATARINA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MINAS, 8., 2010, Belo Horizonte. **Anais...** .Belo Horizonte: Editora da Ufmg, 2010. v. 1, p. 1 - 8. Disponível em: <http://www.cbmina.org.br/si_noticias_6.htm>. Acesso em: 25 mar. 2015.

AMOTZ, Ben; AVRON, Michael. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interests. In: CRESSWELL, Richard; REES, Taylor; SHAH, Norman. **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. New York: Longman Scientific And Technical, 1989. p. 317-337.

ANDERSEN, Robert Arthur. **Algal Culturing Techniques**. Oxford: Elsevier, 2005. 578 p.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington: Apha, 2012.

ASTORG, Pierre. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.406-413, dez. 1997.

BARBARINO, Elisabete; LOURENÇO, Sergio O.. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.447-460, out. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>.

BARKA, Abakoura; BLECKER, Christophe. Microalgae as a potential source of single-cell proteins: a review. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, Liège, v. 20, n. 3, p.427-436, maio 2016.

BASU, Samarpita et al. Enhanced CO₂ sequestration by a novel microalga: *Scenedesmus obliquus* SA1 isolated from bio-diversity hotspot region of Assam, India. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 143, p.369-377, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.010>.

BECKER, Wolfgang. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied Phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 312-351.

BEN-AMOTZ, Ami. Production of beta-carotene from *Dunaliella*. In: COHEN, Zvi. **Chemicals from Microalgae**. London: Taylor & Francis, 1999. p. 196-204.

BICUDO, Carlos; MENEZES, Mariângela. **GÊNEROS DE ALGAS DE ÁGUAS CONTINENTAIS DO BRASIL: CHAVE PARA IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÕES**. 2. ed. São Paulo: Rima, 2006. 502 p.

BISHOP, West M.; ZUBECK, Heidi M.. Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. **Journal Of Nutrition & Food Sciences**, [s.l.], v. 02, n. 05, p.1-6, 2012. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.911-917, ago. 1959.

Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>.
Disponível em:
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-099#.V_b9FfkrLIV>. Acesso em: 06 out. 2014.

BOROWITZKA, Michael A.. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.313-321, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00083-8).

BOROWITZKA, Michael et al. Fats, oils and hydrocarbons. In: BOROWITZKA, Michael; BOROWITZKA, Lesley (Ed.). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 257-287.

BOROWITZKA, Michael. Large-scale algal culture systems: the next generation. **Australas Biotechnol**, Sydney, v. 4, n. 4, p.212-215, jul. 1994.

BOROWITZKA, Michael; BOROWITZKA, Lesley. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 488 p.

BOROWITZKA, Michael; MOHEIMANI, Navid Reza (Ed.). **Algae for Biofuels and Energy**. Delhi: Springer Science+business Media Dordrecht, 2012. 288 p. (5).

BOZBAS, Kahraman. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.542-552, fev. 2008.

BURLEW, John. **Algal Culture: from Laboratory to Pilot Plant**. Washington: Carnegie Institution Of Washington, 1953. 369 p.

CAMACHO-RUBIO, Francisco et al. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.71-86, 5 jan. 1999. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19990105\)62:13.0.co:2-t](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19990105)62:13.0.co:2-t).

[CAMBIA.ORG](http://www.cambia.org). EOS: Algal Bioreactors. 2016. An initiative of Cambia independent non-profit institute creating new technologies, tools and paradigms to promote change and enable innovation.. Disponível em: <<http://www.cambia.org/daisy/eos/4148.html>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

CAMPO, J. A. del et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 64, n. 6, p.848-854, 1 jun. 2004. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1510-5>.

CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; SOUZA, L. S.. Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina. **Rev. Bras. Ciênc. Solo: SEÇÃO IX - POLUIÇÃO DO SOLO E QUALIDADE AMBIENTAL**, Viçosa, v. 27, n. 6, p.1123-1137, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832003000600017>.

CAVALIER-SMITH, Thomas. A revised six-kingdom system of life. **Biol. Rev.**, Cambridge, v. 73, n. 3, p.203-266, ago. 1998. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1017/s0006323198005167>.

CAVALIER-SMITH, Thomas. The chimaeric origin of mitochondria: Photosynthetic cell enslavement, gene-transfer pressure, and compartmentation efficiency. In: MARTIN, William; MÜLLER, Miklos (Ed.). **Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes**. New York: Springer-berlin Heidenberg, 2007. p. 161-200.

CHAUMONT, Daniel. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **J Appl Phycol**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.593-604, dez. 1993. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02184638>.

CHEN, Chung-yuan; LIN, Kuo-ching; YANG, Der-tai. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. **Chemosphere**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.1959-1965, nov. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(97\)00270-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(97)00270-1).

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

CHIU, Chung-jung; TAYLOR, Allen. Nutritional antioxidants and age-related cataract and maculopathy. **Experimental Eye Research**, Boston, v. 84, n. 2, p.229-245, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2006.05.015>.

CHRISTIE, William W.. **GAS CHROMATOGRAPHY AND LIPIDS: A Practical Guide**. 2. ed. Ayr: The Oily Press, 1992. 191 p. Disponível em: <<https://sceqa.files.wordpress.com/2012/05/gaschromatographyandlipids.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

COBBETT, Christopher; GOLDSBROUGH, Peter. PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.159-182, jun. 2002. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>.

COHEN, Zvi. Products from Microalgae. In: RICHMOND, Amos (Ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: Crc Press, 1986. p. 421-454.

CRAGGS, R et al. Phosphorus removal from wastewater using an algal turf scrubber. **Water Science And Technology**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.191-198, 1996. IWA Publishing. [http://dx.doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00354-x](http://dx.doi.org/10.1016/0273-1223(96)00354-x).

DE MARCHIN, Thomas; ERPICUM, Michel; FRANCK, Fabrice. Photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* in outdoor open thin-layer cascade system in high and low CO₂ in Belgium. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 215, p.2-12, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.429>.

DEMIREL, Zeliha; IMAMOGLU, Esra; DALAY, Meltem Conk. Fatty acid profile and lipid content of *Cylindrotheca closterium* cultivated in air-lift photobioreactor. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 90, n. 12, p.2290-2296, 15 abr. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4687>.

DEMMIG-ADAMS, Barbara; ADAMS, William W.. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.21-26, jan. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385\(96\)80019-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385(96)80019-7).

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>.

DISMUKES, G Charles et al. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.235-240, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007>.

DORMIDO, Raquel et al. An Interactive Tool for Outdoor Computer Controlled Cultivation of Microalgae in a Tubular Photobioreactor System. **Sensors**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.4466-4483, 6 mar. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s140304466>.

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K.. Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. **J Appl Phycol**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.811-826, 1 nov. 2006. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4>.

DRAAISMA, René B et al. Food commodities from microalgae. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.169-177, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>.

DWYER, J. H. et al. Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis: The Los Angeles Atherosclerosis Study. **Circulation**, [s.l.], v. 103, n. 24, p.2922-2927, 19 jun. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.103.24.2922>.

FERNÁNDEZ-SEVILLA, José M.; FERNÁNDEZ, F. G. Acién; GRIMA, E. Molina. Biotechnological production of lutein and its applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.27-40, 21 jan. 2010. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2420-y>.

FOURNADZHIEVA, Paul; PILARSKY, Plamen. Mass culture and application of algae in Bulgaria. In: 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON APPLIED ALGOLOGY, 6., 1993, Ceske Budejovike. **Abstracts of the 6th International Conference on Applied Algology**. Czech Republic: International Conference On Applied Algology Press, 1993. p. 20 - 25.

FRANCO, André et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, p.437-448, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v36n3/a15v36n3.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2015.

GARCÍA, J.m. Romero; FERNÁNDEZ, F.g. Acién; SEVILLA, J.m. Fernández. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 112, p.164-170, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.094>.

GAZIANO, J. Michael et al. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascu. **Annals Of Epidemiology**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.255-260, jul. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/1047-2797\(94\)00090-g](http://dx.doi.org/10.1016/1047-2797(94)00090-g).

GERLOFF-ELIAS, Antje; SPIJKERMAN, Elly; SCHUBERT, Hendrik. Light acclimation of *Chlamydomonas acidophila* accumulating in the hypolimnion of an acidic lake (pH 2.6). **Freshwater Biology**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.1301-1314, ago. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01400.x>.

GEZICI, Mustafa; ELICIN, Ahmet Konuralp; GÜRHAN, Recai. Algerin Diesel Motorlarda Kullanım Olanakları. **Journal Of Agricultural Machinery Science**, Ankara, v. 3, n. 8, p.327-335, 17 maio 2011.

GONG, Yangmin et al. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 38, n. 12, p.1879-1890, 1 set. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-011-1032-6>.

GRAHAM, L. K. E.; WILCOX, L. W.. The origin of alternation of generations in land plants: a focus on matrotrophy and hexose transport. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 355, n. 1398, p.757-767, 29 jun. 2000. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2000.0614>.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 90, n. 03, p.487-502, set. 2003. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2003927>.

GRESSLER, Pablo et al. Cultivation of *Desmodesmus subspicatus* in a tubular photobioreactor for bioremediation and microalgae oil production. **Environmental Technology**, Santa Cruz do Sul, v. 35, n. 2, p.209-219, 25 ago. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2013.822523>.

GRILL, E.; WINNACKER, E.-I.; ZENK, M. H.. Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. **Science**, [s.l.], v. 230, n. 4726, p.674-676, 8 nov. 1985. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.230.4726.674>.

GRIMA, E. Molina et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.231-247, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00078-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00078-4).

GROBBELAAR, Johan U.. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal Of Botany**, Africa, v. 1, n. 70, p.140-144, 1 mar. 2004.

GROBBELAAR, Johan U.. Algal Nutrition. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of microalgae culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science Inc, 2004. p. 97-115.

GROSS, Wolfgang. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 433, n. 1/3, p.31-37, 1 ago. 2000. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1004054317446>.

GUEDES, Ana Catarina; AMARO, Helena M.; MALCATA, Francisco Xavier. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.625-644, 20 abr. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md9040625>.

GUIRY, Michael D.; GUIRY, Guthrie M.. **AlgaeBase**. 2016. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676>. Acesso em: 30 jul. 2016.

GUSCHINA, Irina A.; HARWOOD, John L.. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress In Lipid Research**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.160-186, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>.

HARDING, Jon; BOOTHROYD, Ian. Impacts of mining. In: HARDING, Jon et al. **Freshwaters of New Zealand**. Christchurch: The Caxton Press, 2004. Cap. 36. p. 1-10.

HARWOOD, John L.; GUNSTONE, Frank D.; DIJKSTRA, Albert J. (Ed.). **The Lipid Handbook**. Boca Raton: Crc Press, 2007.

HECKATHORN, S. A. et al. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. **American Journal Of**

Botany, [s.l.], v. 91, n. 9, p.1312-1318, 1 set. 2004. Botanical Society of America. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.91.9.1312>.

HEIKKINEN, P. M.; RÄISÄNEN, M. L.; JOHNSON, R. H.. Geochemical Characterisation of Seepage and Drainage Water Quality from Two Sulphide Mine Tailings Impoundments: Acid Mine Drainage versus Neutral Mine Drainage. **Mine Water And The Environment**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.30-49, 30 nov. 2008. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10230-008-0056-2>.

HO, Shih-hsin et al. Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with *Scenedesmus obliquus* FSP-3. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 184, p.131-138, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.062>.

HO, Shih-hsin et al. Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 143, p.163-171, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.043>.

HO, Shih-hsin et al. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 152, p.275-282, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.031>.

HO, Shih-hsin; CHEN, Chun-yen; CHANG, Jo-shu. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 113, p.244-252, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>.

HOEK, Christiaan van Den; MANN, David; JAHNS, H.. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

HU, Qiang. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, Amos (Ed.). **Handbook of Microalgal**

Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. Cap. 5. p. 83-93.

IDAHO SUSTAINABLE ENERGY. **Hybrid Algae Production System (HAPS) to Advance Timetable for Commercial Production.** 2013. Disponível em: <<https://energy.idaho.gov/>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

INOUE, Masahiro. Phytochelatins. **Brazilian Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.65-78, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-04202005000100006>.

INTHORN, Duang Duan. Removal of Heavy Metal by Using Microalgae. In: KOJIMA, Hiroyuki; LEE, Yuan Kun. **Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology.** Hong Kong: Springer-verlag, 2001. p. 111-135.

JEFFREY, Shirley Winifred et al (Ed.). Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. **Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom**, Paris, v. 77, n. 03, p.261-282, 1 maio 1997. Part of: Monographs on Oceanographic Methodology. Unesco Press: Paris. ISSN 0077-104X. Disponível em: <<http://www.marsnetwork.org/imis?module=ref&refid=26657&printversion=1&dropIMISitle=1>>. Acesso em: 21 set. 2014.

KAGI, Jeremias H. R.; VALLEE, Bert L.. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. **The Journal Of Biological Chemistry**, [s.i.], v. 235, n. 1, p.3460-3465, dez. 1960.

KANGAS, Patrick; MULBRY, Walter. Nutrient removal from agricultural drainage water using algal turf scrubbers and solar power. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 152, p.484-489, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.027>.

KAPLAN, Drora. Water Pollution and Bioremediation by microalgae. Absorption and Adsorption of Heavy metals by Microalgae. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of microalgae culture:** Biotechnology and Applied Phycology. 2. ed. Oxford: Wiley & Blackwell, 2004. p. 602-612.

KHAN, A.g et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 41, n. 1-2, p.197-207, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(99\)00412-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(99)00412-9).

KIRK, John T. O.. Advances in Photosynthesis and Respiration. In: KIRK, John T. O. **Light and photosynthesis in aquatic environments**. 2. ed. [s.i.]: Cambridge University Press, 1994. Cap. 5. p. 321-346.

KOBLENTZ-MISHKE, Olga J.; VOLKOVINSKY, Vadim V.; KABANOVA, Julia G.. Plankton primary production of the world ocean. In: W., Wooster. **Scientific Exploration of the South Pacific**. Washington: Nat. Acad. Sci, 1970. p. 183-193.

LARDON, Laurent et al. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. **Environmental Science & Technology**, [s.i.], v. 43, n. 17, p.6475-6481, 01 set. 2009.

LEE, Yuan-kun et al. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. **J Appl Phycol**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.163-169, mar. 1996. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02186320>.

LEE, Yuan-kun; LOW, Chin-seng. Effect of photobioreactor inclination on the biomass productivity of an outdoor algal culture. **Biotechnol. Bioeng.**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.995-1000, nov. 1991. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260380906>.

LEHNINGER, Albert Lester; NELSON, David; COX, Michael. **Principles of Biochemistry**. 5. ed. New York: W.h. Freeman, 2008. 1202 p.

LIAAEN-JENSEN, Synnove. Marine carotenoids. In: SCHEUER, Paul J.. **Marine Natural Products**. 2. ed. Londres: Academic Press, 1978. p. 1-73.

LIMÓN, Piedad et al. Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis*

extracts. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 175, p.203-211, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.150>.

LOBO, Eduardo Alexis et al. Use of epilithic diatoms as bioindicators from lotic systems in southern Brazil , with special emphasis on eutrophication. **Limnology**, [s.i.], v. 16, n. 1, p.25-40, 2004.

MARGOSHES, Marvin; VALLEE, Bert L.. A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 79, n. 17, p.4813-4814, set. 1957. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01574a064>.

MASOJÍDEK, Jiri et al. Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.307-317, 21 jul. 2010. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0774-x>.

MELLENDEZ, Luana B. et al. Determination of Metallothioneins and Phytochelatins using HPLC-ICPMS. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.612-622, 2012. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120047>.

MENEZES, Carlyle; SANTO, Eder; LEAL FILHO, Laurindo. Desenvolvimento de método alternativo para o tratamento de drenagens ácidas de mina (DAM). In: ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINERIOS E METALURGIA EXTRATIVA, Não use números Romanos ou letras, use somente números Arábicos., 2002, Recife. **Anais do XIX ENTMME**. Recife: Entmme, 2002. v. 1, p. 226 - 230.

MENEZES, Rafael Silva. **Estudo do potencial de microalgas dulcícolas como matéria-prima para a cadeia de produção de biodiesel**. 2015. 1 v. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Ambientais, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2015.

MIAO, Xiaoling; WU, Qingyu. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 97, n. 6, p.841-846,

abr. 2006. Elsevier
BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.008>.

MIKULIC, Paulina; BEARDALL, John. Contrasting ecotoxicity effects of zinc on growth and photosynthesis in a neutrophilic alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) and an extremophilic alga (*Cyanidium caldarium*). **Chemosphere**, [s.l.], v. 112, p.402-411, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.049>.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-BRASIL. Cópia do Decreto Legislativo N.2, de 05 de Junho de 1992 nº 2, de 05 de junho de 2000. **Convenção Sobre Diversidade Biológica**. 1. ed. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 05 jun. 2000. n. 2, Seção 2, p. 9-10. Disponível em: <<http://www.bioone.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1896/1413-4411.6.1.59c>>. Acesso em: 25 nov. 2012.

MIRANDA, J.r.; PASSARINHO, P.c.; GOUVEIA, L.. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 104, p.342-348, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.059>.

MISHKE, Ojkoblenz et al. Plankton primary production of the world ocean. In: WOOSTER, William (Ed.). **Scientific Exploration of the South Pacific**. Washington: National Academy Of Science, 1970. p. 183-193.

MOLINA, E. Grima et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.231-247, jan. 1999.

MONSERRAT, José M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 146, n. 1-2, p.221-234, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>.

MONTEIRO, Cristina M. et al. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n.

1, p.97-103, 26 jun. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9542-6>.

MORAIS, Michele Greque de; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, Rio Grande, v. 29, p.1349-1352, 15 maio 2007.

MORALES-AMARAL, Maria del Mar et al. Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source. **Algal Research**, [s.l.], v. 12, p.99-108, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.020>.

MORENO, Ruben G. M. et al. Uma célula eletroquímica de fluxo para modificação permanente de tubo de grafite empregado em absorção atômica. **Química Nova**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.404-407, jun. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422001000300018>.

MORITA, Masahiko et al. Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactors incorporating *Chlorella* sp. under various culture medium flow conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, [s.l.], v. 74, n. 2, p.136-144, 2001. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.1103>.

MOURA, Anderson Jocemar. **MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTA DE AMBIENTES IMPACTADOS E NÃO IMPACTADOS PELA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO (DAM)**. 2014. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MULBRY, W.; KANGAS, P.; KONDRAD, S.. Toward scrubbing the bay: Nutrient removal using small algal turf scrubbers on Chesapeake Bay tributaries. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.536-541, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.026>.

MURASUGI, Akira; WADA, Chiaki; HAYASHI, Yukimasa. Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.1561-1564, nov. 1981.

NAJA, Ghinwa; VOLESKY, Bohumil. The mechanism of metal cation and anion biosorption. In: KOTRBA, Pavel; MACKOVA, Martina; MACEK, Tomas. **Microbial Biosorption of Metals**. 2. ed. Dordrecht: Springer, 2011. p. 19-58.

NASCIMENTO, Fernando et al. Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MINA A CÉU ABERTO & II CONGRESSO BRASILEIRO DE MINA SUBTERRÂNEA, 1., 2002, Belo Horizonte. **Anais...** . Belo Horizonte: Editora do Cbm, 2002. p. 105 - 106.

NEDBAL, Ladislav et al. Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. **J Appl Phycol**, [s.l.], v. 8, n. 4-5, p.325-333, jul. 1996. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02178575>.

NISHIKAWA, Kahoko; TOMINAGA, Noriko. Isolation, Growth, Ultrastructure, and Metal Tolerance of the Green Alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 65, n. 12, p.2650-2656, dez. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.65.2650>.

NOVIS, Phil M.; HARDING, Jon S.. Extreme acidophiles: Freshwater algae associated with acid mine drainage. In: SECKBACH, Joseph. **Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 445-463.

OHSE, Silvana et al. SEQUESTRO DE CARBONO REALIZADO POR MICROALGAS E FLORESTAS E A CAPACIDADE DE PRODUCAO DE LIPÍDIOS PEL. **Insula**, Florianópolis, v. 3, n. 36, p.39-74, mar. 2007.

OJAMAE, Karin. **Growth physiology and photosynthetic performance of green microalgae mass culture grown in a thin-layer cascade.** 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia, Botânica, University Of Tartu, Tartu, 2011.

OLAVESON, Mary M.; STOKES, Pamela M.. RESPONSES OF THE ACIDOPHILIC ALGA EUGLENA MUTABILIS (EUGLENOPHYCEAE) TO CARBON ENRICHMENT AT pH 3. **Journal Of Phycology**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.529-539, set. 1989. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00259.x>.

OMENN, Gilbert S. et al. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 334, n. 18, p.1150-1155, 2 maio 1996. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199605023341802>.

OSWALD, William J.. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). In: BOROWITZKA, Michael A.; BOROWITZKA, Lesley J.. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 357-394.

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

PERALES-VELA, Hugo Virgilio; PEÑA-CASTRO, Julián Mario; CAÑIZARES-VILLANUEVA, Rosa Olivia. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. **Chemosphere**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.1-10, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>.

PROULX, Daniel; LANOÛE, Joël de. Removal of macronutrients from wastewater by immobilized algae. In: MOO-YOUNG (Ed.). **Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. p. 301-310.

PRUVOST, J. et al. Microalgae culture in building-integrated photobioreactors: Biomass production modelling and energetic analysis. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 284, p.850-861, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.118>.

PULZ, Otto. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.287-293, 1 out. 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530100702>.

PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.635-648, 6 ago. 2004. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.

PULZ, Otto; SCHEIBENBOGEN, Karl. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. **Advances In Biochemical Engineering Biotechnology**, [s.l.], p.123-152, jan. 1998. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bfb0102298>.

PUSHPARAJ, Benjamin et al. An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.113-119, jan. 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007988924153>.

QIAN, Haifeng et al. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.56-61, 13 ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.014>.

QIANG, Hu; FAIMAN, David; RICHMOND, Amos. Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. **Journal Of Fermentation And Bioengineering**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.230-236, jan. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0922-338x\(97\)86773-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0922-338x(97)86773-6).

QIN, Song; LIN, Hanzhi; JIANG, Peng. Advances in genetic engineering of marine algae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n.

6, p.1602-1613, nov. 2012. Elsevier
 BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.004>.

RATLEDGE, Colin; GUNSTONE, Frank D.. Structured and Modified lipids. In: GUNSTONE, Frank D.. **Structured and Modified lipids**. Ny: M. Dekker, 2001. p. 351-352.

RAVEN, John A.; EVANS, Michael C. W.; KORB, Rebecca E.. The Role of Trace Metals in Photosynthetic Electron Transport in O₂-Evolving Organisms. **Photosynthesis Research**, [s.l.], v. 60, n. 2/3, p.111-150, mar. 1999. Springer
 Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006282714942>.

RAY, Nicholas E.; TERLIZZI, Daniel E.; KANGAS, Patrick C.. Nitrogen and phosphorus removal by the Algal Turf Scrubber at an oyster aquaculture facility. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 78, p.27-32, maio 2015. Elsevier
 BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.04.028>.

RICE, Eugene et al (Ed.). **STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER**. 22. ed. Washington: American Water Works Association/american Public Works Association/water Environment Federation, 2012. 1496 p.

RICHMOND, Amos. **Handbook of microalgal mass culture**. Flórida: Crc Press Inc., 1990.

RICHMOND, Amos. **Handbook of microalgal mass culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.i.]: Blackwell Publishing, 2004.

RICHMOND, Amos. A prerequisite for industrial microalga- culture efficient utilization of solar irradiation. In: STADLE, T. **Algal Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p. 237-244.

RICHMOND, Amos. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: COHEN, Z.. **Chemicals from Microalgae**. London: Taylor & Francis, 1999. p. 353-386.

RICHMOND, Amos. The challenge confronting industrial microagriculture: high photosynthetic efficiency in large-scale reactors. **Twelfth International Seaweed Symposium**, [s.l.], p.117-121, set. 1987. Springer Science + Business Media. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-4057-4_16.

RITCHIE, R. J.. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. **Photosynthetica**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.115-126, mar. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>.

RODRIGUES, Ana Carolina D. et al. Response Mechanisms of Plants to Heavy Metal Pollution: Possibility of Using Macrophytes for Remediation of Contaminated Aquatic Environments. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.262-276, jan. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20160017>.

ROJÍKOVÁ, Renata; MAR?ÁLEK, Blahoslav. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. **Chemosphere**, [s.l.], v. 38, n. 14, p.3329-3338, jun. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(98\)00566-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(98)00566-9).

ROMANO, Renato. **Análise dos efeitos tóxicos de cádmio sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum* utilizando cromatogr.** 2010. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SAHA, Sushanta Kumar; UMA, Lakshmanan; SUBRAMANIAN, Gopalakrishnan. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.263-272, ago. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-6496\(03\)00162-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-6496(03)00162-4).

SANSAWA, Hiroshi; ENDO, Hiroshi. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 98, n. 6, p.437-444, jan. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723\(05\)00309-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(05)00309-9).

SCHLEPER, Christa. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 177, n. 24, p.7050-7059, dez. 1995.

SCHNEIDER, Rosana C. S. et al. Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications. **Intech**, [s.l.], p.3-24, 3 dez. 2012. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/45895>.

SECKBACH, Joseph. **Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. 11 v.

SETLIK, Jiri et al. Dual purpose open circulation unit for large scale production of algae in temperate zones. **Algolog Stud**, Treborn, v. 1, n. 1, p.111-164, maio 1970.

SHEEHAN, John et al. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae**. Golden: Nrel - National Renewable Energy Laboratory, 1998. 328 p. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2010.

SHI, Xian-ming; ZHANG, Xue-wu; CHEN, Feng. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 27, n. 3-5, p.312-318, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00208-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00208-8).

SILVA, Marla Verginia da. **Avaliação do potencial de uma microalga acidofílica quanto a biorremocção de metais traço em diferentes compartimentos ambientais**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.

SINGH, R.n.; SHARMA, Shaishav. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.2347-2353, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>.

SIRON, Robert; GIUSTI, Gérard; BERLAND, Brigitte. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, Québec, v. 55, n. 3, p.95-100, jun. 1989.

SIRON, Robert; GIUSTI, Gérard; BERLAND, Brigitte. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, Québec, v. 55, n. 3, p.95-100, jun. 1989.

SKÓRZYŃSKA-POLIT, Ewa; BASZYŃSKI, Tadeusz. Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. **Plant Science**, [s.l.], v. 128, n. 1, p.11-21, set. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452\(97\)00126-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452(97)00126-x).

SLEGGERS, P. M. et al. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, [s.l.], v. 105, p.395-406, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.068>.

SOARES, Diniara. **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS MARINHAS EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/34887/R> - T - DINIARA SOARES.pdf?sequence=1>. Acesso em: 25 out. 2012.

SOUZA, Luana dos Santos et al. Morphological and ultrastructural characterization of the acidophilic and lipid-producer strain *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 (Chlorophyta) under different culture conditions. **Protoplasma**, Wien, v. 3, n. 1, p.1-14, 20 set. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00709-016-1030-7>>. Acesso em: 04 out. 2016.

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial applications of microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 101,

n. 2, p.87-96, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.101.87>.

STEFFENS, J C. The Heavy Metal-Binding Peptides of Plants. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.553-575, jun. 1990. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.003005>.

STEPHENSON, Anna L et al. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. **Biofuels**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.47-58, jan. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4155/bfs.09.1>.

SUPHI, Oncel S.; ., Oguz Akpolat. An integrated photobioreactor system for the production of *Spirulina platensis*. **Biotechnology (faisalabad)**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.365-372, 1 mar. 2006. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2006.365.372>.

TEMPLETON, David W.; LAURENS, Lieve M.I.. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. **Algal Research**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.359-367, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.013>. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/281295627_Nitrogen-to-protein_conversion_factors_revisited_for_applications_of_microalgal_biomass_conversion_to_food_feed_and_fuel>. Acesso em: 07 ago. 2015.

TERRY, Kenneth L.; RAYMOND, Lawrence P.. System design for the autotrophic production of microalgae. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 7, p.474-487, out. 1985.

TORZILLO, Giuseppe. Sperimentazione sulla coltura massiva di *Spirulina maxima* in sistema tubolare nel biennio 1979–80. In: PROSPETTIVE DELLA COLTURA DI SPIRULINA IN ITALIA, 1., 1980, Firenze. **Atti del Conv.** Firenze: Accademia Dei Georgofili, 1980. p. 85 - 97.

TORZILLO, Giuseppe. Tubular Bioreactors. In: VONSHAK, A.. **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 101-115.

TRAVIESO, L et al. A helical tubular photobioreactor producing Spirulina in a semicontinuous mode. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.151-155, jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0964-8305\(01\)00043-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0964-8305(01)00043-9).

TREDICI, Mario R. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. **Biofuels**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.143-162, jan. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4155/bfs.09.10>.

TREDICI, Mario R.. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of microalgae culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 566.

TREDICI, Mario R.. Photobioreactors. In: FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W.. **Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation**. New York: Wiley & Sons, 1999. p. 395-419.

TREDICI, Mario R.; ZITTELLI, Graziella Chini. Cultivation of Spirulina (Arthrospira) platensis in flat plate reactors. In: VONSHAK, A.. **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 117-130.

UNIFESP. **Biotecnologia**. Disponível em: http://www.sjc.unifesp.br/biotec_ict/?page_id=46>. Acesso em: 19 ago. 2015.

VARELA, João C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynth Res**, [s.l.], v. 125, n. 3, p.423-436, 29 abr. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>.

VARELA, João C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, [s.l.], v. 125, n. 3, p.423-436, 29 abr. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>.

VARSHNEY, Prachi et al. Effect of high CO₂ concentrations on the growth and macromolecular composition of a heat- and high-light-tolerant microalga. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.2631-2640, 15 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0797-4>.

WAHLEN, Bradley D.; WILLIS, Robert M.; SEEFELDT, Lance C.. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.2724-2730, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.026>.

WANG, Bei; LAN, Christopher Q.; HORSMAN, Mark. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.904-912, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>.

WANG, Hui-min David et al. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 184, p.355-362, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>.

WANG, Liang et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 129, p.289-295, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.062>.

WANG, Liang et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 129, p.289-295, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.062>.

WANG, Liang et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate

or lipid. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 129, p.289-295, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.062>.

WANG, Xiaojin; ZHANG, Xuwu. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 126, p.307-313, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.059>.

WEISSMAN, Joseph C.; GOEBEL, Raymond P.; BENEMANN, John R.. Photobioreactor design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. **Biotechnol. Bioeng.**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.336-344, mar. 1988. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260310409>.

WIJFFELS, René H; KRUSE, Olaf; HELLINGWERF, Klaas J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.405-413, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.004>.

XIE, Youping et al. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144, p.435-444, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.064>.

XIN, Li; HONG-YING, Hu; YU-PING, Zhang. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3098-3102, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>.

YANG, Zhi-kai et al. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. **Biotechnol Biofuels**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.67-73, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-67>.

ZAPATA, Manuel; RODRÍGUEZ, Francisco; GARRIDO, José L.. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-

containing mobile phases. **Marine Ecology Progress Series**, [s.l.], v. 195, n. 1, p.29-45, mar. 2000. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/meps195029>.



ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGLEA, Paulo (Org.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ZITELLI, Graziella et al. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: RICHMOND, Amos; HU, Qiang (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2013. Cap. 2. p. 225-266.

7. APÊNDICES

7.1 PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, ENTRADA NA FASE NACIONAL DO TRATADO DE COOPERAÇÃO DE PATENTES PROTOCOLADO (INPI - PROCESSO: BR1020160131022).

Em função dos resultados obtidos nos capítulos anteriores, foi efetuado o pedido de patente do HAPS desenvolvido, protocolado no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI).

	07/06/2016 870160026455 19:23
 00.000.2.2.15.0858248.8	
Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT	
Número do Processo: BR 10 2016 013102 2	
Dados do Depositante (71)	
<hr/>	
Depositante 1 de 1	
Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Santa Catarina	
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica	
CPF/CNPJ: 83899526000182	
Nacionalidade: Brasileira	
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa	
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA, BAIRRO TRINDADE	
Cidade: Florianópolis	
Estado: SC	
CEP: 88040-900	
País: Brasil	
Telefone:	
Fax:	
Email:	

8. ANEXOS

8.1 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NA TESE.

Meio de cultivo MC (modificado por LCA-UFSC).

Reagente	Quantidade (g/L)
NaNO ₃	1,050
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,250
NaH ₂ PO ₄	0,658
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,020
NaHCO ₃	1,000

Meio MAM (pH 3.6) (Olaveson & Stokes 1989).

Solução	Estoque	Preparo da Sol. Estoque	Volume (mL L ⁻¹)
1.	(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g/L	10 mL
2.	CaCl ₂ . 2H ₂ O	1 g/L	10 mL
3.	MgSO ₄ . 7H ₂ O	50 g/L	10 mL
4.	KH ₂ PO ₄	30 g/L	10 mL
5.	NaCl	3 g/L	10 mL
6.	Na ₂ EDTA	20 g/L	0.5 mL
7.	Metais Traços	Tabela abaixo	1 mL
8.	FeSO ₄ . 7H ₂ O	4.98 g/L	1 mL
	H ₂ SO ₄	1mL	
9.	Vitaminas F/2	Tabela abaixo	1 mL

Composição dos metais traços

Componente	g/Litro
1. H ₃ BO ₃	2.86
2. MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
3. ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222
4. NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.390
5. CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
6. Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494

Composição da Vitamina

Solução	Estoque	Preparo da Sol. Estoque	/100mL
1.	Biotina	0.1 mg/mL	1mL/100mL
2.	Vitamina B12	5mg/mL	0.1mL/100mL
3.	Tiamina HCL		20mg/100mL