

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA**

Lucas Coelho Cantú

**DESENVOLVIMENTO DE UM COMPLEMENTO PARA RAÇÃO ANIMAL A PARTIR
DA BIOMASSA DE MICROALGAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2016

LUCAS COELHO CANTÚ

**DESENVOLVIMENTO DE UM COMPLEMENTO PARA RAÇÃO ANIMAL A
PARTIR DA BIOMASSA DE MICROALGAS**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Curitiba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Real Prado

Curitiba

2016

RESUMO

CANTÚ, Lucas. **Desenvolvimento de um complemento para ração animal a partir da biomassa de microalgas**. 2016 Trabalho de conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

A elevada emissão de CO₂, além de agravar o efeito estufa em áreas urbanas, representa um sério problema sendo extremamente prejudicial à qualidade de vida das pessoas. As microalgas têm sido utilizadas nos processos de tratamento de emissões atmosféricas devido à capacidade de biofixação de CO₂ em sua biomassa celular, a qual pode ser comercialmente utilizada para produção de biocombustíveis, para fins nutricionais e obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo utilizar a biomassa liofilizada de microalgas cultivadas no Laprebb-Utfrpr, para a produção de um complemento para ração pisciana, e assim, além de sanar o problema da proliferação excessiva das algas agregando valor às mesmas, contribuir para o melhor conhecimento científico da microalga *Chlorella sp.* Após o processo de cultivo, separação e liofilização para preservação das amostras foram realizados ensaios de caracterização, como: proteínas, lipídeos, cinzas, umidade, carboidratos e ensaios biológicos. Foram realizados os testes físico-químicos na microalga *Chlorella sp.*, na ração *Bottom Fish* pura, e em misturas de ração pisciana com a microalga *chlorella* em 3 diferentes proporções, verificando um aumento do teor proteico em 0,83% e um aumento no teor lipídico de 239,47%. No teor de carboidratos há um decréscimo de 6,97%, como no de cinzas e umidade que caem 34,65% e 24,26% respectivamente na substituição de 50% de microalga na composição da ração. Como os peixes exigem uma demanda maior de proteína para seu desenvolvimento que os outros animais, e o teor proteico aumenta a medida que a microalga é incorporada na ração, a microalga *Chlorella sp.* com teor de proteína bruta de 36,9%, se apresenta como promissor complemento para ração animal pisciana.

Palavras-chave: *Chlorella sp.* Proteínas . Ração para peixes.

ABSTRACT

CANTÚ, Lucas. **Development of a supplement for animal feed from microalgae biomass.** 2016 Monography (Bachelor in Chemistry) - Academic Department of Chemistry and Biology, Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2016.

The high emission of CO₂, besides aggravating the greenhouse effect in urban areas, represents a serious problem as it is extremely harmful to the quality of life of the people. Microalgae have been used in the treatment processes of atmospheric emissions due to the biofuel capacity of CO₂ in their cellular biomass, which can be commercially used for the production of biofuels, for nutritional purposes and obtaining natural compounds with high market value. In this sense, the present work had as objective to use lyophilized biomass of microalgae cultivated in Laprebb-Utfr, for the production of a complement for fishes ration, and thus, besides remedying the problem of excessive proliferation of algae adding value to them, contribute for the best scientific knowledge of the microalgae *Chlorella sp.* After the cultivation, separation and lyophilization process for the preservation of the samples, characterization tests were carried out, such as proteins, lipids, ashes, moisture, carbohydrates and biological tests. The physical-chemical tests were carried out in the microalgae *Chlorella sp.*, in the pure Bottom Fish ration, and in fishes rations with the microalgae *Chlorella sp.* in 3 different proportions, with an increase in the protein content of 0.83%, an increase in the lipid content of 239.47%. In the carbohydrate content there is a decrease of 6.97%, as the ash and humidity fall 34.65% and 24.26% respectively in the replacement of 50% of microalgae in the feed composition. As fish demand a higher protein demand for their development than the other animals, and the protein content increases as the microalga is incorporated in the diet, the microalgae *Chlorella sp.* with crude protein content of 36.9% is presented as promising supplement for fishes animal ration.

Keywords: *Chlorella sp.* Proteins. Fish feed

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sistema de cultivo microalga <i>Chlorella sp</i> LABREB UTFPR campus ecoville..... | 24 |
| Figura 2. Microalga <i>Chlorella sp</i> liofilizada e ração <i>bottom fish pura</i> | 26 |
| Figura 3. Misturas microalga e ração em 3 proporções diferentes - 80% ração e 20% <i>chlorella</i> (A), 70%ração e 30% <i>chlorella</i> (B), e 50%ração e 50% <i>chlorella</i> (C)..... | 27 |
| Figura 4. Gráfico da curva de crescimento microalga <i>Chlorella sp</i> População microalgal x Tempo (dias)..... | 29 |
| Figura 5. Representação da proliferação do cultivo, primeiro dia de cultivo (a), sétimo dia (b) e décimo terceiro dia de cultivo no reator 1 (c)..... | 30 |
| Figura 6. Separação por decantação da microalga <i>Chlorella sp</i> nos cones de Imhoff..... | 30 |
| Figura 7. Microalga <i>Chlorella sp</i> liofilizada obtida por litro de solução..... | 31 |
| Figura 8. Gráfico da composição centesimal <i>Chlorella sp</i> e ração <i>Bottom Fish</i> | 33 |
| Figura 9. Gráfico da análises centesimais misturas de Ração com <i>Chlorella sp</i> | 34 |
| Figura 10. Gráfico da variação da composição centesimal das 3 misturas (Ração + <i>Chlorella sp</i>)..... | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. - Composição de algumas algas e alimentos em % de matéria seca..... | 18 |
| Tabela 2. - Composição do meio Chu..... | 26 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2. OBJETIVOS..... | 11 |
| 2.1. Geral..... | 11 |
| 2.2. Específicos..... | 11 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 12 |
| 3.1. Aspectos Gerais das Microalgas..... | 12 |
| 3.2. Características e classificação das microalgas..... | 13 |
| 3.2.1. <i>Chlorella vulgaris</i> | 14 |
| 3.3. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS..... | 15 |
| 3.4. SISTEMAS DE CULTIVO..... | 16 |
| 3.4.1. Sistemas abertos..... | 17 |
| 3.4.2. Sistemas fechados..... | 17 |
| 3.4.3. Sistemas híbridos..... | 18 |
| 3.5. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO..... | 18 |
| 3.6. PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DE MICROALGAS..... | 20 |
| 3.6.1. Carboidratos..... | 21 |
| 3.6.2. Pigmentos..... | 22 |
| 3.6.3. Lipídeos..... | 22 |
| 3.6.4. Proteínas..... | 23 |
| 3.7. Associação brasileira de piscicultores e pescadores..... | 23 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1. Cultivo das microalgas..... | 27 |
| 4.2. Recuperação da biomassa..... | 30 |
| 4.3. Caracterização da biomassa..... | 30 |
| 4.3.1. Determinação da composição centesimal das misturas de <i>Chlorella sp</i> e ração <i>Bottom Fish</i> | 31 |
| 4.4. Análises microbiológicas..... | 32 |
| 4.4.1. Contagem de bolores e leveduras..... | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 5.1. Curva de crescimento..... | 33 |
| 5.2. Obtenção da biomassa..... | 34 |
| 5.3. Análises centesimais..... | 36 |
| 5.4. Análises microbiológicas..... | 42 |
| 5.5. Análises estatísticas..... | 42 |

| | |
|-------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO..... | 44 |
| REFERÊNCIAS | 45 |

1. INTRODUÇÃO

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes que convertem CO₂ majoritariamente em lipídeos, proteínas e carboidratos. Além de serem as principais produtoras primárias de oxigênio tanto no ambiente fluvial/lacustre quanto marinho, utilizam CO₂ e nutrientes no processo de fotossíntese.

A produção de microalgas tem sido amplamente utilizada atualmente como alternativa para biomitigação de CO₂, remoção da matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, para geração de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol, na produção de moléculas de origem lipídica com capacidade surfactante entre outros, a partir da conversão da biomassa através de processos químicos e biotecnológicos (ANTELO, et al.,2008; KUMAR, 2011).

A biomassa microalgal apresenta cerca de 50% de carbono na sua composição, assim o fornecimento deste nutriente aos cultivos representa um importante componente dos custos de produção, seja gasoso na forma de dióxido de carbono, ou sólido, principalmente na forma de bicarbonato (VONSHAK, 1997).

Com a possibilidade de utilização das microalgas no tratamento de efluentes gasosos, surge a problemática da proliferação microalgal, que gera grande quantidade de resíduos.

Dentre as diversas possibilidades de utilização para as microalgas, uma área de destaque é a alimentícia, devido a excelente gama de nutrientes provenientes na biomassa microalgal, e sua possibilidade de indução pelos meios de cultivo (CORDEIRO, 2006). Por exemplo, *Spirulina sp*, quando cultivada em tanques rasos, produz 400 vezes mais do que a carne bovina utilizando a mesma área (HENRIKSON, 2009)

No aspecto econômico, devido ao alto custo da alimentação, que representa de 30 a 70% dos custos de produção em cultivos intensivos, existe uma pressão considerável para a redução dos excessos nas formulações, principalmente dos nutrientes de preço mais elevados responsáveis pelo teor proteico, a farinha de peixe e o farelo de soja. O desenvolvimento de rações de alto valor nutricional e ambientalmente corretas, que garantam a economicidade das criações, depende do aprofun-

damento dos conhecimentos sobre as espécies produzidas, principalmente em relação ao manejo alimentar dos peixes e exigências nutricionais (ABRAPPEES,2014).

Para compor uma ração balanceada é necessário dispor e combinar adequadamente os ingredientes compreendendo um núcleo de alimentos quanto à concentração de nutrientes.

O principal fator nutricional que determina o uso das rações para os peixes é o teor proteico-energético visto que é o constituinte majoritário na sua composição. Para as *espécies de peixes tropicais*, as farinhas elaboradas à base do resíduo, resultante da extração de óleo das sementes de oleaginosas como a soja, girassol, algodão, colza (canola), coco, entre outros, podem ser empregadas como fonte proteicas (ABRAPPEES,2014).

Essas fontes proteicas de origem vegetal, inferiores às de origem animal, apresentam menor digestibilidade, são deficientes em metionina e lisina e, com alguns fatores antinutricionais. Entretanto, apresentam-se como a opção mais econômica para a confecção de rações. (CPT, curso de piscicultura 2016)

A fim de viabilizar a formulação de rações com base em valores de nutrientes o mais próximo possível da realidade, deve-se lançar mão de análises de laboratório, que indicarão a real composição em nutrientes das matérias-primas disponíveis (EMBRAPA, 2015)

Assim, proposta para a produção de um complemento para ração pisciana a partir da biomassa microalgal, consistiu em cultivar a microalga *Chlorella sp* no LAPREBB(laboratório de pesquisa em bioenergia e biotecnologia) UTFPR, obter a biomassa liofilizada para preservação da amostra e realizar testes físico-químicos de quantificação de proteínas, lipídeos, carboidratos, cinzas e umidade, nas microalgas cultivadas no Laprebb-Utfpr, na ração bottom fish pura, e em 3 misturas de microalga e ração. Com as análises de composição centesimal verificou-se um aumento no teor de proteínas bruto, constituinte essencial para ração pisciana a medida em que a biomassa produzida periodicamente nesse sistema é incorporada na ração Bottom fish .

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Testar a viabilidade da microalga *Chlorella sp* como um complemento para ração pisciana, com características semelhantes às rações estabelecidas no mercado, a partir da biomassa de microalgas.

2.2. Específicos

Cultivar a microalga *Chlorella sp* no LAPREBB em quantidade suficiente para realização dos ensaios de composição centesimal.

Obter biomassa liofilizada de microalga *Chlorella sp* cultivada no laprebb – laboratório de pesquisa relacionada a biomassa e bioenergia, na utfpr

Caracterizar os constituintes da biomassa da microalga *chlorella sp* por meio de análises físico-químicas (carboidratos, proteínas, lipídeos, cinzas e umidade); e análise microbiológica de bolores e leveduras para verificar sua possibilidade de utilização como ração animal.

Realizar um estudo comparativo de substituição de microalga *Clorella sp* na composição de uma ração comercial da marca *Bottom Fish* avaliando as suas características.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Aspectos Gerais das Microalgas

Microalgas são microrganismos unicelulares, heterogêneos, coloniais ou filamentosos, coloridos, foto autótrofos, procarióticos ou eucarióticos. O termo “microalgas” não tem valor taxonômico, uma vez que engloba microrganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (PÉREZ, 2007; OLAIZOLA, 2003). De acordo com a classificação proposta por SIEBURTH *et al.* (1978), o tamanho das microalgas pode variar entre 20-200 μm .

Elas pertencem à parte de um grupo muito diversificado de organismos, e que apresentam fundamental importância, pois são considerados responsáveis por pelo menos 60 % da produção de biomassa primária da Terra (CHISTI, 2007).

Estes microrganismos têm sido tradicionalmente classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular (TOMASELLI, 2004). Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do(s) cloroplasto(s) e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além desses, técnicas de biologia molecular igualmente têm sido usadas (HU, 2004).

As microalgas têm uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, sendo capazes de uma alteração metabólica como resposta a mudanças das condições ambientais. Assim sua composição química depende principalmente de condições de crescimento como pH, luminosidade, temperatura e nutrientes (MATA, 2010; CONVERTI, 2009).

Algumas vantagens das microalgas em relação às plantas terrestres são: velocidade maior de crescimento, que proporciona maior produtividade; diferente das plantas terrestres que apresentam compostos localizados em locais específicos, as microalgas tem a mesma composição bioquímica, pois são unicelulares; podem ser induzidas à maior síntese ou acúmulo de compostos de interesse por meio da mani-

pulação das condições de cultivo; e por fim não precisam de condições especiais de cultivo, tendo boa resposta até mesmo em águas residuárias (DERNER, 2006; RICHIMOND, 2004).

Este grupo diversificado de organismos destaca-se por apresentar elevada importância bio-histórica e ecológica, sendo os responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, com uma contribuição de forma geral no processo de produção do oxigênio estimada em torno de 50 a 60 %, e por sua importância econômica, com uso diversificado em vários países do mundo e numerosas aplicações comerciais (BORGES *et al.*, 2007).

Os gêneros de *Desmodesmus* e *Chlorella* vêm sendo distinguidas nos últimos anos como as mais eficazes no processo de fixação de CO₂ acoplado ao tratamento de águas residuais e à síntese de lipídeos para a produção de biodiesel (BLERSCH *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2012; XIN *et al.*, 2010).

3.2. Características e classificação das microalgas

Atualmente as microalgas procarióticas e eucarióticas estão classificadas em divisões distintas: as procarióticas podem ser agrupadas nas divisões Cyanophyta e Prochlorophyta, e as eucarióticas são agrupadas em Glaucophyta, Rodophyta, Cryptophyta, Euglenozoa, Cercozoa, Haptophyta, Dinophyta, Ochroophyta, Streptophyta, Chlorophyta e Heterohontophyta (GUALTIERI, 2006).

A classificação bioquímica das microalgas está fundamentada em características como natureza e localização dos pigmentos (clorofilas, ficobilinas, carotenos e carotenoides), dos carboidratos de reserva (amido ou laminarana) e da disposição dos tilacóides, sistema de membranas situado no interior dos plastídeos, que contêm pigmentos (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

Na composição da biomassa microalgal, além do carbono (C), estão presentes pelo menos 19 elementos químicos. Alguns são necessários em concentrações na ordem de miligramas por litro, como H, N, O, P, S, K, Na, Ca e Mg.

Outros podem ser detectados como elementos traços ou micronutrientes e normalmente são requeridos em concentrações de nanogramas a microgramas por

litro, como Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, B e V. Esses micronutrientes são incorporados em moléculas orgânicas essenciais, como em uma variedade de coenzimas (CoA, cobamamida e etc) que participam de reações primordiais à vida da célula (REYNOLDS, 2006).

3.2.1. *Chlorella vulgaris*

Divisão taxonômica de *Chlorella vulgaris*: Filo *Chlorophy*, classe *Trebouxiophyceae*, ordem *Chlorella*, família *Chlorellaceae*, gênero *Chlorella* e espécie *Chlorella vulgaris*.

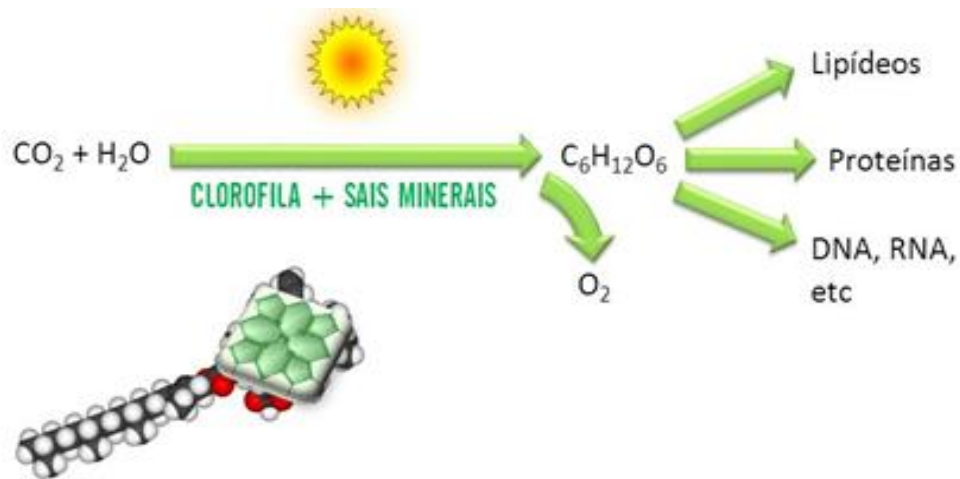
Chlorella vulgaris é um gênero de algas verdes unicelulares ou clorófitas, do filo *Chlorophyta*, de forma esférica e medem de 2 a 8 micrometros de diâmetro. São microrganismos fotossintetizantes, eucarióticos e com reprodução assexuada, sendo o grupo mais diversificado de todas as algas e na sua maioria estão inseridas em ambientes de água doce e poucas espécies são terrestres ou marinhas. Apresentam as formas de vida mais variadas, podendo ser unicelulares flageladas e não-flageladas, coloniais móveis e não móveis, algas filamentosas e algas formando lâminas celulares (RAVEN, 2001; DUARTE, 2001).

Apresenta um promissor potencial para aplicação na produção de alimentos, pois além de ser excelente fonte de proteínas, é uma boa fonte de sais minerais como fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio (BECKER E VENKATARAMAN, 1981).

Tem como principal polissacarídeo de reserva a β -1,3 glucana, conhecido como laminarina, um imunoestimulante ativo que atua sobre os radicais livres ajudando na eliminação dos lipídeos do sangue, e possuem clorofila a e b, caroteno e xantofilas. Seus cloroplastos são envoltos por um envelope de duas membranas, sem retículo endoplasmático (BECKER, 2004; KRIENITZ, 2004).

3.3. Aplicações biotecnológicas das microalgas

As microalgas possuem aplicações biotecnológicas distintas, podendo-se usar a biomassa algal, seca ou úmida, como fonte de alimentos tanto para humanos como para animais, e vem se destacando por apresentar potencial fonte de proteínas, ácidos graxos insaturados, vitaminas, sais minerais, pigmentos, enzimas, antibióticos e outros metabólitos biologicamente ativos (PULL E GROSS, 2004; GOUVEIA et al., 2006).



Para a elaboração de alimentos, extração de alguma substância de interesse, é preciso separar a biomassa do meio de cultura.

O processo de separação envolve uma ou mais etapas, como floculação, centrifugação e filtração, por exemplo. A seguir, a biomassa é desidratada, podendo-se usar diversas técnicas, como a secagem ao sol, o “spray-drying” e a liofilização.

Para a extração dos compostos, as células microalgais são rompidas, empregando métodos de homogeneização, ultra-som, choque osmótico, solventes, enzimas etc. As substâncias de interesse são então recuperadas e, na maioria dos casos, sofrem algum processo de purificação, como ultrafiltração, ou fracionamento (MOLINA GRIMA, 2004).

Além do cultivo visando à produção para a obtenção de biomassa, muitas microalgas são cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados

nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico – EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides, que apresentam propriedades terapêuticas (GILL e VALIVETY, 1997; TRIPATHI et al., 1999).

Atualmente, são comercializadas como suplementos alimentares e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também incorporadas em massas, doces, bebidas etc., tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais (BECKER, 2004; COLLA et al., 2004; PULZ e GROSS, 2004).

A biotecnologia de microalgas também demonstra versatilidade em outros setores, podendo ser aplicadas no tratamento de águas residuais devido à sua capacidade de biorremediação, ou seja, de retirar do meio aquoso alguns elementos químicos, especialmente íons metálicos e compostos orgânicos, e no tratamento de efluentes gasosos, devido a sua capacidade de fixação de CO₂ (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; BERTOLDI et al., 2008).

A fixação de CO₂ por microalgas é muito mais rápida e eficaz do que pelas plantas terrestres, por isso tem sido muito utilizadas para a biomitigação das emissões de CO₂, é considerado um dos processos mais eficientes de remoção deste gás, sem ter necessidade de mudanças profundas na matriz energética mundial e nas atividades produtivas (HOLLOWAY, 2003; HO et al., 2011).

3.4. Sistemas de cultivo

O cultivo de microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro, e tem sido realizado em larga escala para suprir necessidades comerciais, em sistemas fechados de produção fotossintética de biomassa, denominados fotobiorreatores; sistemas fechados de produção por nutrição heterotrófica, denominados fermentadores; ou em tanques, sistemas chamados “abertos” (LOURENCO, 2006).

Segundo BOROWITZKA, 1999 os sistemas de cultivo de microalgas podem ser sistemas abertos, sistemas fechados e sistemas híbridos, e os fatores necessários para avaliar qual sistema deve ser utilizado incluem: as características biológi-

cas da espécie de alga utilizada, o clima, a área de implantação do sistema, a disponibilidade e custo de água, nutrientes e energia, e o produto final desejado. Para saber qual o sistema mais adequado para a produção em larga escala devem ser comparadas suas propriedades básicas tais como, a capacidade de controle da temperatura, a sua eficiência na utilização da luz, estresse hidrodinâmico exercido sobre as microalgas e a capacidade de manter a cultura estéril, sem a presença de outros tipos de microalgas ou predadores.

3.4.1. Sistemas abertos

Os sistemas abertos são utilizados na maioria dos processos de produção em escala comercial, pelo seu menor custo e facilidade de construção. São normalmente feitos em lagoas (COPLIN, 2012).

Estes sistemas variam desde lagoas simples, sem nenhum equipamento para realizar a mistura da cultura, a lagoas circulares onde há a presença de um braço mecânico para realizar a mistura e os sistemas conhecidos como *raceways* que consistem tipicamente de canais independentes de circuito fechado de recirculação em que uma turbina gera um fluxo que é guiado em torno de curvas por defletores colocados no canal de fluxo (AZEREDO, 2012).

3.4.2 Sistemas fechados

Os sistemas fechados constituem em estruturas chamadas fotobiorreatores, que podem ser construídos em ambientes externos ou internos.

O cultivo em ambientes externos, utiliza a energia solar, por isso está sujeito a diferenças no rendimento devido as condições climáticas, como variações na luz e temperatura que influenciam diretamente no processo de fotossíntese, impactando as saídas dos sistemas produtivos (LEE, 2001).

As principais vantagens do sistema de cultivo fechado são: prevenção de contaminações atmosféricas, perda de água por evaporação, evitar intempéries climáticas como chuva, e ocupam menos espaço. Além disso, a produtividade de biomassa pode chegar a treze vezes mais quando comparada a um sistema aberto (CHISTI, 2007).

3.4.3 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos mesclam os sistemas de cultivo abertos e fechados oferecendo um melhor custo-benefício e levando a obtenção de melhores resultados. Este sistema consiste em duas etapas: a primeira de cultivo em um sistema fechado onde as condições controladas minimizam contaminações por outros organismos e estimulam a divisão celular, e na etapa seguinte em cultivo aberto, para expor as células a condições de estresse de nutrientes e promover a síntese de substâncias de interesse (HUNTLEY, 2007; DEMIRBAS, 2011).

3.5 Condições de crescimento

Independente do sistema utilizado para produzir microalgas, diversos fatores podem influenciar a concentração e a composição da biomassa microalgal, induzindo as microalgas a diferentes funções. Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas da espécie e a interação com outros organismos, e os fatores físico-químicos são principalmente reportados com a intensidade luminosa, temperatura, pH, aeração, concentração de nutrientes e concentração de CO₂ (CHISTI, 2007; SPOLAORE, 2006).

Dentre os fatores físico-químicos podemos destacar a temperatura, que é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos. Temperaturas constantes, alcançada por sistemas de refrigeração, são mais adequadas para o cultivo apresentando maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies.

A temperatura utilizada para a manutenção das culturas é geralmente a mais próxima do habitat natural do organismo. De forma geral a faixa de temperatura ideal para o cultivo de microalgas é de 16 °C a 35 °C, de modo que a extrapolação deste limite poderá ser fatal para varias espécies. (LOURENÇO, 2006; GUALTIERI, 2006)

Outro fator a ser considerado é a incidência luminosa, pois uma vez que as microalgas são seres fotossintetizantes, a distribuição e intensidade luminosa interferem diretamente no seu crescimento. Quando fornecida em excesso sobre a sua superfície, causa foto inibição e conseqüentemente, baixa eficiência fotossintética diminuindo a conversão de energia em biomassa. A eficiência fotossintética aumenta até que a iluminação torne-se um fator limitante, e por outro lado, a produtividade é negativamente afetada se a iluminação for insuficiente ou havendo zonas de sombra. (ERIKSEN, 2008)

O controle do pH também é essencial, pois é responsável pela disponibilidade de vários elementos químicos, que podem ser solúveis ou precipitar dependendo do pH do cultivo, assim deve ser controlado para que os nutrientes do meio sejam efetivamente absorvidos pelas microalgas. As formas de carbono dissolvidas no meio são influenciadas pelo pH, que aumenta com o consumo de CO₂ podendo atingir níveis muito elevados. (LOURENÇO, 2006)

Para garantir uma distribuição homogênea das células, transferência de gases através da interface gás-líquido, iluminação e manutenção da temperatura, deve-se promover agitação e aeração do sistema de forma branda para não danificar as células, apenas mantendo a eficiência fotossintética (GUALTIERI, 2006; WALTER, 2011).

Nos cultivos, os principais elementos limitantes para o crescimento das microalgas são carbono, fósforo, ferro e nitrogênio. O carbono é o componente mais importante de todas as substâncias sintetizadas pelas células (carboidratos, lipídeos, proteínas, etc.) e representa cerca de 50% da biomassa microalgal, sendo que em cultivos realizados em grande escala a suplementação com CO₂ é realizada para aumentar as velocidades de crescimento de biomassa. São fontes de carbono a difusão natural de CO₂ do ar atmosférico para o meio de cultivo, adição de sais de carbonatos e bicarbonatos. (GROBBELAAR, 2004; COPLIN 2012).

O nitrogênio é de grande importância para o metabolismo primário, quando há disponibilidade ocorre o aumento na síntese de proteínas e pigmentos fotossintetizantes. Por outro lado, a falta de nitrogênio no meio pode aumentar o teor lipídico das microalgas, pois a depleção de nitrogênio direciona o metabolismo das microalgas para a produção de componentes de reserva, como ácidos graxos saturados.

O ferro é o micronutriente mais importante para as algas, participando da respiração celular, reduzindo o nitrato e o nitrito participando da fixação de nitrogênio molecular, e também é cofator de várias enzimas .

Outro nutriente importante nas funções celulares é o fósforo, que participa de todas as trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais (ATP, ácidos nucleicos e fosfoenzimas), sendo fundamental na síntese de lipídeos e carboidratos e no fornecimento de fosfatos para a produção de energia (LOURENÇO, 2006).

Constata-se que muitas espécies de algas os absorvem ativamente mesmo quando a concentração interna é maior que a externa, o que lhes permite continuar a crescer e reproduzir-se mesmo após o esgotamento de nutrientes do meio. O meio de cultivo Chu 12 é o mais utilizado para cultivos de clorofíceas, mas é possível que se use apenas N P K no cultivo de algas (ESTEVES, 1998)

3.6 Produtos obtidos a partir de microalgas

Na alimentação humana e animal são usados os principais produtos obtidos na biomassa algal: proteínas, carboidratos, ácidos graxos de elevada importância, como os da família ômega 3 e ômega 6, vitaminas, entre outras substâncias capazes de enriquecer o valor nutricional dos alimentos e produzir efeitos promotores de saúde como melhora nas respostas imunes, fertilidade e melhor controle de peso, além de pigmentos naturais, como os carotenoides de destaque também na indústria cosmética e farmacêutica (SPOLAORE *et al.*, 2006; DERNER *et al.*, 2006).

Algumas espécies de microalgas apresentam taxas mais elevadas desses compostos do que comparadas com outros alimentos, como mostrado na tabela 1:

Tabela 1- Composição de algumas algas e alimentos em % de matéria seca.

| Alimento | Proteínas | Carboidratos | Lipídeos |
|---------------------|-----------|--------------|----------|
| Carne bovina | 43 | 1 | 34 |
| Leite | 26 | 38 | 28 |
| Arroz | 8 | 77 | 2 |
| Feijão | 37 | 30 | 20 |
| Anabaena cylindrica | 43 - 56 | 25 - 30 | 4 - 7 |
| Chlorella vulgaris | 51 - 58 | 12 - 17 | 14 - 22 |
| Dunaliella salina | 57 | 32 | 6 |
| Spirulina maxima | 60 - 71 | 13 - 16 | 6 - 7 |

Fonte: Adaptado de Becker (2004).

3.6.1 Carboidratos

Os carboidratos constituem uma das principais fontes de energia. De forma geral, as taxas de carboidratos de algas podem chegar a 50% do seu peso seco, e são principalmente compostos por glucose, amido, celulose/hemicelulose e outros polissacarídeos de composição mais heterogênea (HO et al., 2013).

Uma variedade de polissacarídeos, de diversas fontes, pode ter habilidade de enriquecer o sistema imunológico, porém, os mais ativos são as β -D-(1-3)-glucanas, algumas vezes referenciadas como β -D-(1-3, 1-6)- glucanas, ou laminaranas. Estes polissacarídeos estão bem estabelecidos como imunoestimulantes, possuem características estruturais conhecidas para esta atividade e podem ser isolados por simples técnicas de extração (BOHN e BeMILLER, 1995)

Polissacarídeos provenientes de algas tem sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica, devido as suas propriedades antioxidantes, anticoagulantes e anti-inflamatórias (CHEN, 2011)

3.6.2 Pigmentos

Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1995).

É possível incrementar a síntese destes compostos através da manipulação das condições de cultivo, usualmente por algum estresse ambiental (BOROWITZKA 1993). Os carotenóides, pigmentos de grande interesse comercial, funcionam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários, sendo que cada espécie pode conter entre 5 e 10 tipos de um universo de aproximadamente 60 diferentes carotenóides presentes nas células microalgais. Diversas espécies podem acumular grande concentração de betacaroteno, astaxantina ou cantaxantina, por exemplo, os quais têm uma ampla aplicação como corantes naturais e como antioxidantes (BAKER e GUNTER, 2004; PULZ e GROSS, 2004).

3.6.3 Lipídeos

Os lipídeos algais são compostos por glicerol ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. O conteúdo de lipídeos da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco, e em certas condições de cultivo pode chegar até 85%, sendo obtido por condições de estresse (deficiência de nutrientes, anaerobiose, temperaturas extremas) na fase de crescimento da biomassa (BECKER, 2004).

Os lipídeos de algumas espécies contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, notadamente de EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3) (VOLKMAN et al., 1989; ZHUKOVA & AIZDAICHER, 1995; ROBLES MEDINA et al., 1998).

3.6.4 Proteínas

As proteínas são usadas principalmente como suplementos alimentares, adicionadas a alimentos ou para ração animal.

As microalgas são capazes de utilizar tanto carbono inorgânico como orgânico, e dependendo da espécie contém entre 40 e 70% de proteínas em sua composição, além de sua produção de forma contínua ocupar pequenas áreas elas apresentar tempo de geração curto, o que torna as microalgas fontes alternativas de proteína (BENEMAN, 1990).

Além disso, autores avaliaram as propriedades antifúngicas de proteínas de microalgas, revelando resultados promissores (CORDEIRO , 2006).

Alguns alimentos como fontes de carboidratos, lipídeos e proteínas são fundamentais na formulação de rações, denominados essencialmente energéticos e os energéticos também fornecedores de proteínas e de proteicos com alto teor de energia. Exemplos de alimentos utilizados são: gorduras de aves e bovinos, óleo de soja bruto ou degomado como alimentos essencialmente energéticos; cevada em grão, o soro de leite seco, quirera de arroz, e grãos de milho moídos como alimentos energéticos fornecedores de proteínas, e soja extrusada e farelo de soja como alimentos proteicos com alto teor de energia. (EMBRAPA, 2015).

3.7 Associação brasileira de piscicultores e pesqueiros

ABRAPPESQ é uma associação que visa a união das entidades ou pessoas da área de Piscicultores sendo também um órgão organizador e administrador da área de Piscicultura. A ABRAPPESQ tem como objetivo o auxílio aos Piscicultores e Pesqueiros, servindo de apoio para pesquisas, incentivando cursos e indicando profissionais especializados da área, para possíveis dificuldades de Piscicultores e Pesqueiros.

Ultimamente se observa um crescimento nas análises de composição centesimal e minerais, devido a crescente demanda de projetos na área de nutrição e metabolismo de suínos e aves e peixes e também pela revitalização da área de espectrometria NIR, que permite prever diversos parâmetros de composição de rações e ingredientes.

Essas análises devem garantir que o balanceamento das rações atenda estritamente as exigências nutricionais nas diferentes fases de produção. O excesso de nutrientes nas rações é um dos maiores causadores de poluição ambiental, portanto buscam-se aqueles que apresentam alta digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes e que sejam processados adequadamente, em especial quanto a granulometria. Em complementação a mistura dos componentes da ração deve ser uniforme e o arraçamento dos peixes deve seguir boas práticas que evitem ao máximo o desperdício. Através da nutrição e do manejo da alimentação e da água devem ser atendidas as necessidades básicas dos animais, sem causar deficiências nutricionais clínicas ou subclínicas e sem provocar intoxicações crônicas ou agudas, aumentando a resistência às doenças.

Até poucas décadas atrás, a forma mais comum de aquicultura era o cultivo extensivo, sem a adição de alimento suplementar, em que apenas a produtividade natural sustentava uma baixa densidade de indivíduos, resultando numa baixa eficiência de produção.

Atualmente, o advento de técnicas modernas de aquicultura estimulou a progressiva transformação dos cultivos extensivos em cultivos semi-intensivos ou intensivos, numa evolução essencial para garantir a viabilização econômica dos cultivos.

Intensificar um cultivo implica em aumentar a quantidade de biomassa de animais produzidos por área, à custa do fornecimento constante de alimento nutricionalmente adequado. Uma vez que tal suprimento de alimento perfaz de 30 a 70% do total dos custos operacionais da aquicultura intensiva (KAUSHIK, 1989), a alimentação se tornou o fator unitário mais importante para a administração dos cultivos modernos.

Dentre os peixes cultivados, 88% da produção é composta por peixes de hábitos onívoros e/ou herbívoros, que consomem anualmente 73 mil toneladas (ton) de farinha de peixe na ração. Já os peixes carnívoros constituem 12% da produção

aquícola, porém, utilizam 660 mil ton de farinha de peixe, ou seja, cerca de 90% da farinha de peixe utilizada na aquicultura mundial é destinada às espécies carnívoras (Abrappesq, 2014).

O cultivo intensivo das espécies carnívoras é economicamente atraente porque as espécies selecionadas possuem elevado valor comercial (FAO, 1994), mesmo dependendo do uso de farinha de peixe e de outros recursos pesqueiros como fonte básica de proteína e de lipídios (TACON, 1994).

Em todo cenário mundial, a farinha de peixe é a fonte de proteínas de origem animal mais abundante para a manufatura de ração para animais domésticos. Ela é considerada como a fonte nutricional ideal para suprir as necessidades proteicas e lipídicas dos peixes carnívoros, apesar de ser um ingrediente relativamente caro e com fornecimento limitado. Em 1990, cerca de 86% da farinha de peixe produzida no mundo foi utilizada na composição de rações para aves, suínos e ruminantes. Os 14% restantes foram das rações para animais aquáticos (TACON, 1993).

Como animais ectotérmicos, os peixes possuem baixa necessidade energética, pois despendem menos energia que os demais animais domésticos para regular e manter a temperatura corporal. Gastam menos energia para locomoção na água que os animais terrestres, e excretam os resíduos nitrogenados na forma de amônia no lugar de uréia ou ácido úrico, economizando no catabolismo das proteínas. Apesar da sua toxicidade, a amônia apresenta vantagens em relação ao ácido úrico ou uréia principalmente porque o peixe vive na água, e as substâncias de baixo peso molecular e os lipídeos de alta solubilidade, permitem que a amônia não-ionizada se difunda facilmente através da brânquia. A amônia ionizada é trocada por sódio nas brânquias para a manutenção da alcalinidade relativa e balanço iônico do fluído interno. A conversão da amônia em uréia ou ácido úrico implica em gasto energético. A energia para manutenção (atividades voluntárias e metabolismo basal) é também menor nos peixes que nos animais terrestres. Por exemplo, a carpa (*Cyprinus carpio*) e o peixe dourado (*Carassius auratus*) excretam de 6 a 10 vezes mais nitrogênio via brânquias do que através dos rins. Do total da excreção nitrogenada, 90% é na forma de amônia, e apenas 10% consiste em uréia (ABRAPESQ, 2014).

Os animais aquáticos possuem necessidades proteicas maiores em relação às dos animais domésticos tradicionais (TACON, 1993). Por exemplo, o bagre onívo-

ro *catfish Ictalurus punctatus* tem uma necessidade proteica de 35% de proteína bruta, enquanto o valor decresce para 18%, 16% e 11% para aves, suínos e ruminantes, respectivamente.

Neste sentido o presente trabalho tem o enfoque a utilização da biomassa produzida pelas microalgas, produzidas no LAPREBB – Laboratório de Pesquisa Relacionada a Biomassa e Bioenergia UTFPR, para a obtenção de proteínas e lipídeos e carboidratos, que podem ser usados como um complemento para ração animal para peixes comparativamente com alguns produtos utilizados normalmente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no LAPREBB Laboratório de Pesquisa Relacionada a Biomassa e Bioenergia, na UTFPR sede ecoville, ambiente com temperatura média de 25°C, bem arejado e de baixa umidade. O estudo seguiu uma linha de pesquisa existente no TECPAR, que utilizava as microalgas *Chlorella sp* e *Westella* nos seus ensaios. A escolha da microalga *Chlorella sp* para o presente estudo, foi devido ao seu promissor potencial proteico (MATOS 2012), constituinte fundamental para o desenvolvimento dos peixes (TACON 1993).

4.1 Cultivo das microalgas

Os inóculos foram preparados no LAPREBB, com cepas das microalgas *Chlorella sp* a partir de uma quantidade de 10 % de solução de microalgas em relação ao volume do cultivo em um sistema que simula um fotobiorreator. O sistema era iluminado por um conjunto composto por 8 lâmpadas frias, com foto período de 24h.

O sistema representado na figura 1 é constituído por 2 recipientes cada um capacidade total de 40L, e 2 balões de 6L, onde foram utilizados um terço da capacidade de cada recipiente a fim de facilitar o manejo do sistema para a sua manutenção e separação.



Figura 1 Cultivo de microalga *Chlorella sp* no laboratório LAPREBB

O meio de cultivo utilizado foi meio Chu com composição indicada na Tabela 2, suplementado com ar comprimido. Para um litro de cultivo utilizar 10 ml da solução 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 1 ml da solução 7, 9 e 10.

Tabela 2- Composição do meio Chu.

| Reagente | Fórmula Molecular | Concentração (g.L ⁻¹ ou mg.L ⁻¹) |
|-------------------------------------|---|--|
| Nitrato de sódio | NaNO ₃ | 25g |
| Cloreto de cálcio di-hidratado | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 2,5g |
| Sulfato de magnésio hepta-hidratado | MgSO ₄ . 7 H ₂ O | 7,5g |
| Fosfato de potássio dibásico | K ₂ HPO ₄ | 7,5g |
| Fosfato de potássio monobásico | KH ₂ PO ₄ | 17,5g |
| Cloreto de sódio | NaCl | 2,5g |
| Tríplex III | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O | 50g |
| Hidróxido de potássio | KOH | 31g |
| Sulfato ferroso hepta-hidratado | FeSO ₄ . 7H ₂ O | 4,98g |
| Acido bórico | H ₃ BO ₃ | 11,42g |
| Sulfato de zinco hepta-hidratado | ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 8,82mg |
| Cloreto de manganês tetra-hidratado | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 1,44mg |
| Oxido de molibdênio | MoO ₃ | 0,71mg |
| Sulfato de cobre penta-hidratado | CuSO ₄ . 5H ₂ O | 1,57 mg |
| Nitrato de cobalto hexa-hidratado | Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O | 0,49mg |

Fonte: (CHU, 1942)

O cultivo exige monitoramento periódico diário, uma vez que a suplementação por ar comprimido tem que ser contínua para manutenção das condições ideais de sobrevivência para as microalgas.

4.2 Recuperação da biomassa

Para determinação do dia exato de separação das microalgas, dia em que a proliferação é máxima, foi feito um estudo cinético do crescimento da *Chlorella sp.* O estudo foi realizado pelo método de contagens de células na câmara de Neubauer, sendo construído um gráfico da população microalgal vs Tempo em dias.

Após 13 dias da inoculação, quando a população atingiu seu pico, a coleta foi realizada. A biomassa foi separada do fotobiorreator pelo método de decantação, utilizando 3 cones de Imhoff com capacidade de 1L cada. A separação foi realizada em 20 bateladas devido a pequena capacidade do sistema, onde a microalga era deixada em repouso por 24h para decantação completa, o concentrado coletado em recipientes plásticos de 40mL de capacidade, usando metade da sua capacidade visto que o volume aumenta durante o congelamento. Logo após ser congelada, a biomassa foi liofilizada (Labconco free zone) a fim de eliminar toda água presente na amostra garantindo a sua preservação e manutenção das características. Após o processo de liofilização que garante a integridade dos constituintes da microalga, a biomassa foi armazenada a temperatura de 4°C. Após cada batelada o clarificado era devolvido para o reator, a fim de manter os nutrientes necessários para o meio de cultivo.

4.3 Caracterização da biomassa

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa Relacionada à Biomassa e Bioenergia (LAPREBB) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Ecoville, Curitiba-PR.

Para caracterizar a biomassa, foram definidos parâmetros e ensaios físico-químicos como teor de Nitrogênio total, lipídios, carboidratos, cinzas e umidade.

Inicialmente, foram feitos os ensaios separadamente, primeiro na biomassa liofilizada da microalga *Chlorella sp* (a), e em seguida na ração *Bottom fish* pura (b), como indicado na figura 2.



Figura 2. Microalga *Chlorella sp* liofilizada e ração *bottom fish* pura.

Com a biomassa liofilizada, foram feitos ensaios de determinação de nitrogênio total e o teor proteico, que foi realizada seguindo o método de Micro-Kjeldahl (MILLER, 1945). Após a determinação de nitrogênio, os lipídeos totais foram extraídos da biomassa através do método de Soxhlet.

O teor de cinzas e umidade foi determinado gravimetricamente seguindo metodologia (IAL, 2005) descrito na Farmacopéia Brasileira (1988), e então a quantificação de carboidratos foi realizada pela diferença entre 100 e a soma dos teores de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas. Os mesmos ensaios foram repetidos para ração Bottom Fish pura, e para 3 misturas de ração e microalga em proporções diferentes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.1 Determinação da composição centesimal das misturas de *Chlorella sp* e ração *Bottom Fish*.

Após a determinação da composição centesimal da microalga *Chlorella sp* isolada, e da ração pura, foram feitas misturas de microalga com ração Boltom fish, para verificar suas características em conjunto e seu comportamento em três diferentes proporções: primeira 80% ração e 20% *chlorella sp* (A), segunda 70%ração e 30%*chlorella sp* (B), e terceira 50%ração e 50%*chlorella sp* (C), representadas na figura 3.

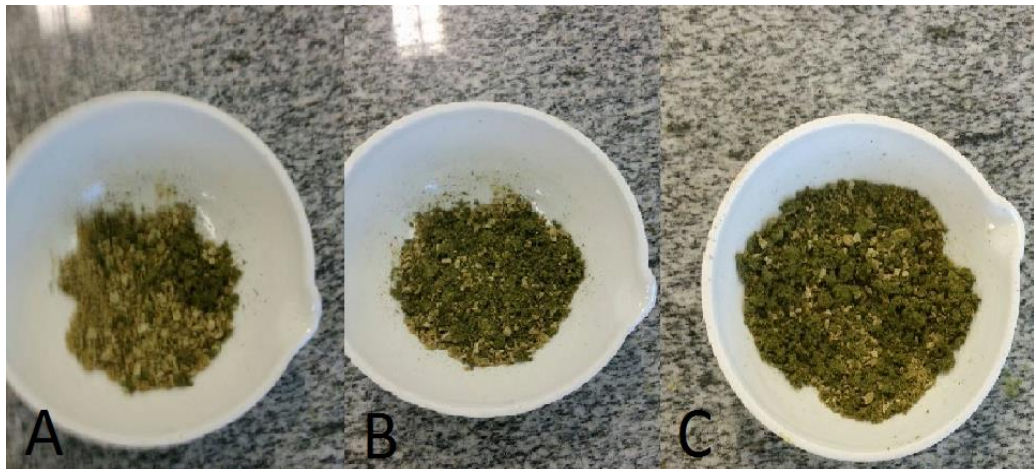


Figura 3. Misturas de Ração *Bottom fish* e microalga *Chlorella sp.*

Inicialmente a ração foi moída, utilizando um (cadinho e um pistilo de porcelana esterilizados), até transforma-la em pó. Logo após a ração foi peneirada a fim de deixa-la na mesma granulometria da microalga *chlorella sp* liofilizada, então foram feitas as misturas em relação ao peso necessário para a realização de cada ensaio, foram feitas 9 misturas, sendo 3 de cada composição, e em seguida foram feitas as análises físico-químicas de composição centesimal nas amostras.

4.4 Análises microbiológicas

4.4.1 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada na microalga *Chlorella sp* isolada, visto que a ração deve seguir a legislação vigente.

A contagem das células seguiu o método de contagem de bolores e leveduras presente no manual dos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal. Foram feitas 3 coletas em períodos diferentes, no início do inóculo, no sétimo dia e no dia da separação, cada uma com 3 amostras, totalizando 9 amostras para a análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1 Curva de crescimento

A partir do estudo cinético realizado pelo método de contagem de células, foi construído o gráfico representado pela figura 4, em que é possível identificar que o dia ideal para a separação das microalgas é o sexto dia de cultivo, onde a população atinge seu pico máximo, permanecendo constante até o décimo terceiro dia, e no décimo quarto dia ocorre um decaimento exponencial.

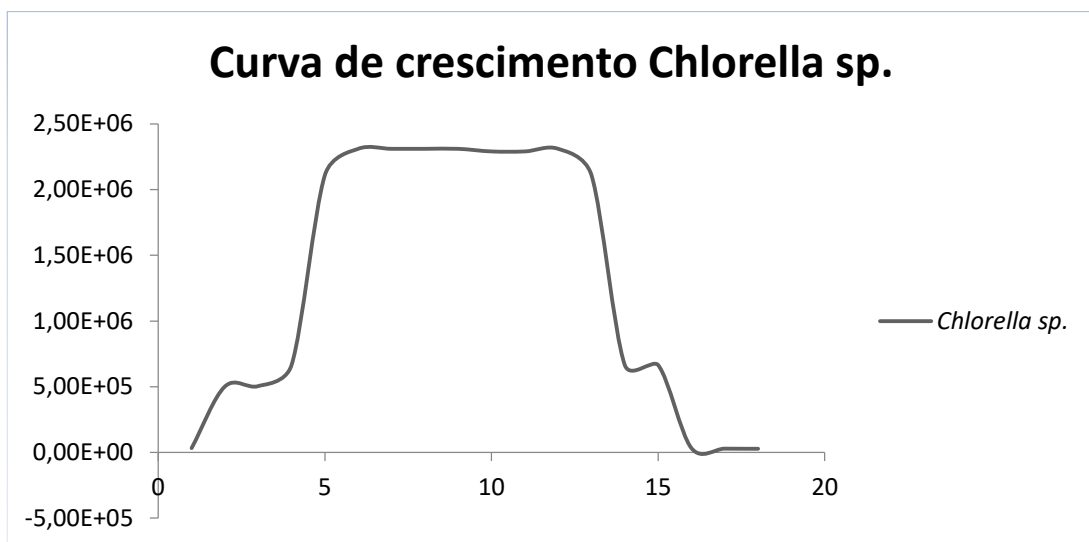


Figura 4. variação População microalgal x Tempo (dias).

Na imagem representada pela figura 5, é possível verificar o aumento na concentração microalgal no decorrer dos dias de cultivo, onde (a) é dia do inóculo, (b) o sétimo dia de cultivo e (c) o décimo terceiro dia de cultivo, onde a concentração é máxima.



Figura 5, primeiro dia de cultivo (a), sexto dia (b) e décimo quarto dia de cultivo (c).

O cultivo da microalga *Chlorella sp* exige um monitoramento contínuo do sistema, com intervalo máximo de 2 dias, visto que a aeração do sistema e sua iluminação são fundamentais para a manutenção das características ideais do sistema.

Durante o presente estudo, foi confirmado que durante o período de 3 dias sem suplementação do sistema por ar comprimido ocorre a morte das células, sendo destruída a população presente no fotobiorreator, sendo necessário a limpeza total do sistema, uma nova inoculação e um início de novo cultivo. A iluminação do sistema é outro fator limitante de crescimento, visto que as microalgas são microrganismos fotossintetizantes e necessitam da luz para suas atividades metabólicas. O período de 5 dias sem iluminação do sistema, resulta na morte das células.

5.2 Obtenção da biomassa

A solução de microalgas (*Chlorella sp*) cultivada nos fotobiorreatores apresentava uma coloração verde-escura, evidenciando a presença de elementos fotossintetizantes no sistema. Após o período de 24 horas de decantação nos cones

de Imhoff , foi possível distinguir nitidamente o concentrado microalgal do clarificado (Figura 6).



Figura 6 Microalga *Chlorella sp* decantando nos cones de Imhoff

Dos 20L de solução contidos no recipiente submetidos a decantação, foram coletados 0,678 L de concentrado microalgal, totalizando 3,39% do volume processado. Lembrando que o clarificado restante nos cones era transferido novamente para o fotobiorreator para a manutenção dos nutrientes necessários para o meio de cultivo. O método de separação dos cones de Imhoff se demonstrou eficiente para a separação, porém o tempo necessário é longo visto que o sistema é composto por 3 cones de capacidade de 1L cada e demanda 24 h para a decantação completa.

Ao final da liofilização foram obtidos 7,1358 g de biomassa seca da microalga *Chlorella sp*. Um rendimento de 0,3567g de biomassa seca por 1L de solução do fotobiorreator submetido à liofilização indicado na figura 7. Pereira (2013) conseguiu valores de 0,451 g.L⁻¹ de biomassa a partir de um mix de microalgas com predominância do gênero *Scenedesmus sp* em meio Chu. Vieira (2011) obteve um rendimento de 0,4307 g.L⁻¹ de *Chlorella sp* cultivada em fotobiorreator de bancada, em meio Watanabe e suplementado com gás de um incinerador de produtos sólidos tóxicos. O rendimento mais baixo pode ser explicado pelo método de separação não

sofisticado, visto que o dia da separação foi determinado a partir de uma curva de crescimento realizada pelo método de contagem de células.

Devido ao baixo rendimento e produção, foram necessários 8 meses de cultivo para a obtenção de biomassa suficiente para a realização das análises. O sistema exige completa dedicação, visto que a suplementação por ar comprimido tem que ser contínua, para a manutenção saudável das células.



Figura 7. Biomassa liofilizada obtida por litro de solução.

5.3 Análises centesimais

A partir das análises físico-químicas do teor de nitrogênio total, lipídios, carboidratos, cinzas e umidade, foi determinada a composição centesimal da microalga *Chlorella sp* e da ração para peixes *Bottom Fish* isolada, apresentadas no gráfico na Figura 8.

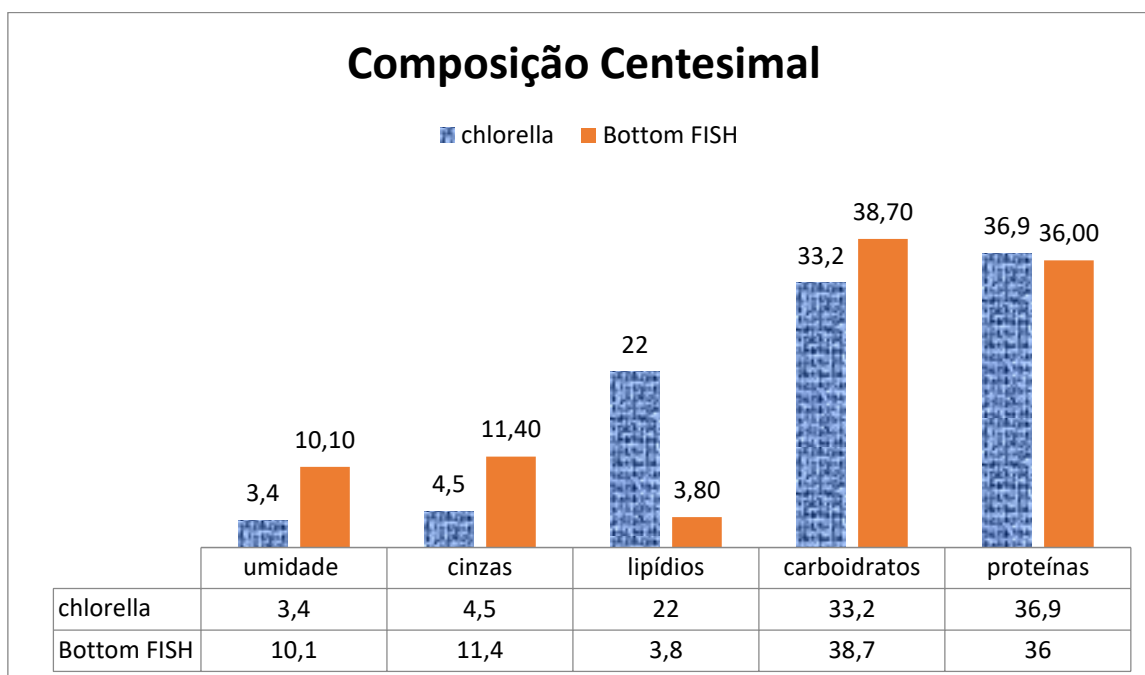


Figura 8. Composição centesimal da microalga *Chlorella sp* e ração *Bottom Fish* respectivamente.

A partir do gráfico representado na figura 8, podemos identificar que assim como a ração pisciana, a microalga *Chlorella sp* apresentou proteína como componente majoritário, seguida de carboidratos, lipídios e outros constituintes, como minerais.

Portanto, estes dados mostram que a *Chlorella sp* apresenta características próximas as da ração pisciana principalmente com relação ao teor proteico, se apresentando como um potencial alimento para os peixes que possuem elevada necessidade de proteínas.

Para *Spirulina platensis*, Donato et al., (2010) encontraram valores de 59,65% de proteína, 11,7% de carboidratos e 3,29% de lipídeos, em meio de cultivo não informado, enquanto Huang (2006) obteve valores de 62,43% de proteína, 3,47% de carboidratos e 17,3% de lipídeos, utilizando meio de cultivo Zarrouk.

Para a microalga *Chlorella sp* Matos (2012) obteve valores menores para a composição centesimal da biomassa de *Chlorella sp*: 25,04% de proteínas, 15,09% de carboidratos e 3,70% lipídeos, cultivada em meio concentrado de dessalinização.

Estas diferenças de valores da composição centesimal das microalgas

mostram que a importância do meio de cultivo utilizado e outros fatores como temperatura, pH, nível de aeração, induzem respostas metabólicas diferentes às microalgas influenciando na composição da biomassa.

Pelas mesmas análises físico-químicas também foi determinada a composição centesimal de três misturas de *Chlorella sp* e ração Bottom Fish em diferentes Proporções: 80%ração e 20%chlorella, 70%ração e 30%chlorella, e 50%ração e 50% chlorella, apresentadas no gráfico da Figura 9.

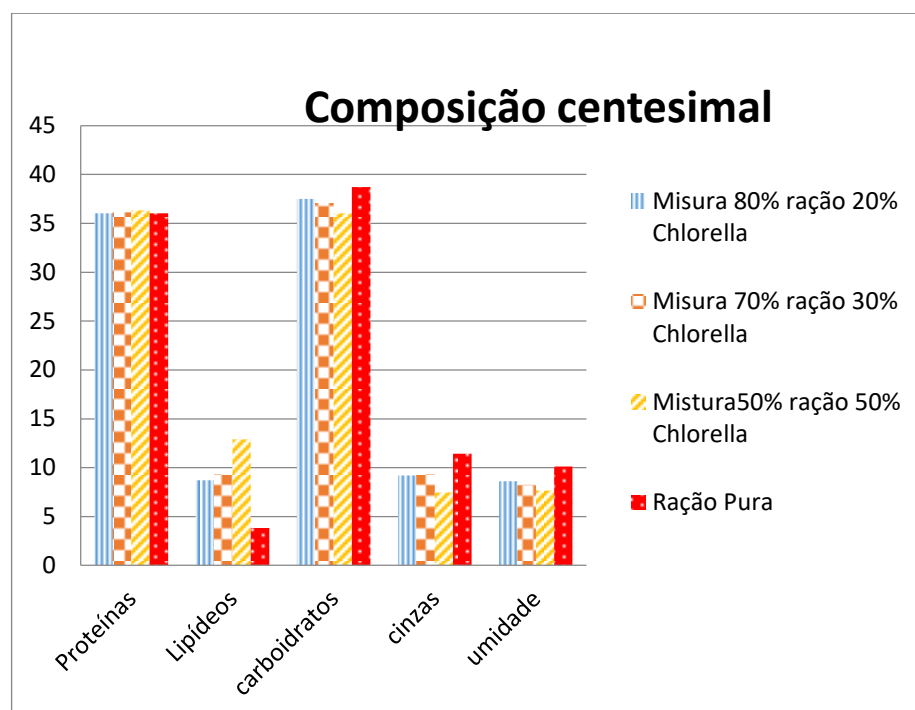


Figura 9. Gráfico análises centesimais misturas de Ração com *Chlorella sp*

A partir do gráfico ilustrado na figura 9, que contém os resultados de composição centesimal das três misturas de *Chlorella sp* e ração *Bottom fish*, em ordem crescente de adição de microalga na composição, seguida da composição da ração pura, observa-se que composição da ração sofre alteração mínima no teor proteico-energético com a adição de 50% de *Chlorella sp* na sua composição. Como estes são os principais constituintes da ração pisciana, o presente estudo indica grande possibilidade de utilização da microalga *Chlorella* em substituição a parte da ração convencional utilizada, ou possivelmente ser utilizada sozinha como alimento para os peixes in natura.

Para avaliar o efeito do acréscimo de microalga na composição da ração foi feito um gráfico da variação da composição centesimal da ração *Bottom Fish* com a adição da microalga *Chlorella sp*, ilustrado na figura 10.

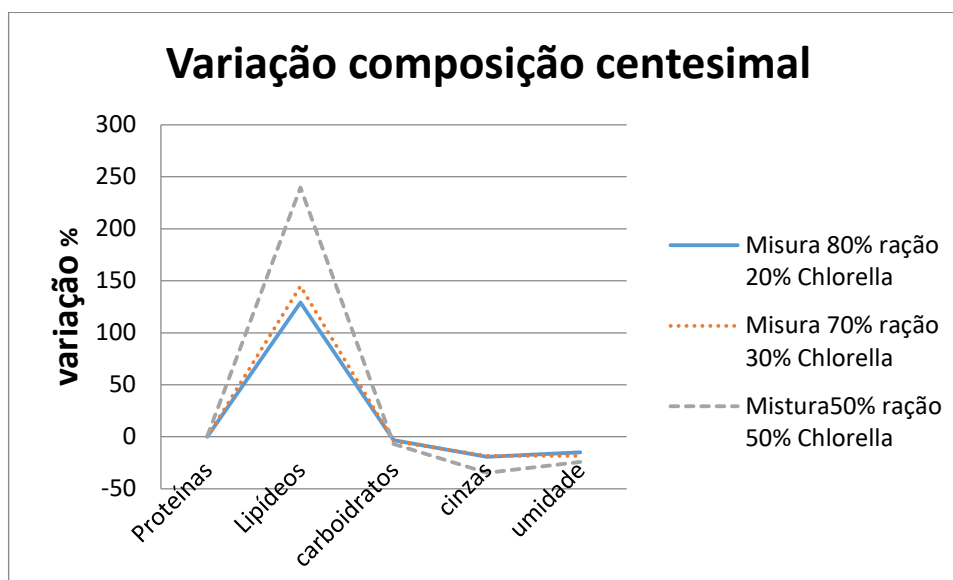


Figura 10. Gráfico variação da composição centesimal das 3 misturas (Ração + *Chlorella sp*).

A partir do gráfico acima, pode-se confirmar que o teor proteico da mistura ração bottom fish + *Chlorella sp*, aumenta $0,83 \pm 0,1\%$ confirmando a possibilidade de utilização desta alga para suplementação de peixes e organismos aquáticos, pois possuem necessidade proteica elevada, como o bagre onívoro catfish *Ictalurus punctatus* que necessita de 35% de proteína bruta na sua alimentação (TACON, 1993). Também fica nítida a tendência observada no gráfico de que quando maior a adição de *Chlorella sp* na mistura, mais as características do complemento se aproximam a da alga pura, tendo um aumento no teor lipídico de $239,47 \pm 0,23\%$, e no teor de carboidratos um decréscimo de 6,97%, como o de cinzas e umidade que caem $34,65 \pm 0,13\%$ e $24,26 \pm 0,05\%$ respectivamente.

Devido a elevada necessidade proteica dos peixes (abrappesq, 2014) a microalga *Chlorella* se apresenta como um promissor substituinte de ingredientes utilizados para este fim responsáveis pela maior parte do custo da ração, como farinha de peixe, um ingrediente caro e limitado no mercado, e farelo de soja que cada vez mais vem substituindo a farinha de peixe, possuindo além do teor de

proteínas elevado, um teor lipídico que supre a demanda de ácidos graxos de peixes de água doce (Abrappesq , 2014).

As diversas análises físico químicas realizadas no LAPREBB, confirmam potencial nutricional da microalga *Chlorella sp*, com grande quantidade de proteína bruta na sua biomassa e grante teor lipídico (Donato et al.,2010). A utilização neste sentido se mostrou muito promissora, uma vez que mesmo substituindo 50% de ração por microalga a característica proteica se eleva 0,82% e o teor lipídico 239,47%, e aumentam a medida que a alga é incorporada na ração *bottom fish*.

A tabela abaixo confirma o potencial da microalga para a utilização como complemento para ração animal, comparando a composição da sua biomassa com a de alguns alimentos.

| Alimento | Proteínas | Carboidratos | Lipídeos |
|---------------------|-----------|--------------|----------|
| Carne bovina | 43 | 1 | 34 |
| Leite | 26 | 38 | 28 |
| Arroz | 8 | 77 | 2 |
| Feijão | 37 | 30 | 20 |
| Anabaena cylindrica | 43 - 56 | 25 – 30 | 4 – 7 |
| Chlorella vulgaris | 51 - 58 | 12 – 17 | 14 – 22 |
| Dunaliella salina | 57 | 32 | 6 |
| Spirulina máxima | 60 - 71 | 13 – 16 | 6 – 7 |

Tabela de composição dos alimentos em % de matéria seca.

Fonte: Adaptado de Becker (2004)

Em 2011 o departamento de engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará, realizou um trabalho pelo pesquisador Wladimir Ronaldo Lobo, que utilizou a microalga *Chlorella sp* como suplemento alimentar durante a larvicultura de tilápia do Nilo provenientes da Estação de Piscicultura Rodolpho Von Ihering do Departamento de Obras Contra as Secas – DNOCS (Pentecoste, Ceará, Brasil). O estudo consistiu na comparação com a taxa de crescimento das larvas cultivada em água verde (95% *Microcystis* e 5% *Golenkina*), em águas claras, e em um tanque contendo a microalga *Chlorella spp* in natura.

Em relação aos dados de desempenho, após 28 dias de cultivo, os peixes apresentaram pesos e comprimentos médios de $0,23 \pm 0,12\text{g}$ e $2,35 \pm 0,16\text{cm}$; $0,35 \pm 0,11\text{g}$ e $2,82 \pm 0,20\text{cm}$ e $0,27 \pm 0,03\text{g}$ e $2,54 \pm 0,15\text{cm}$ para os tratamentos em águas claras (controle), com *Chlorella sp.* e em água verde, respectivamente. A análise estatística evidenciou que as médias de peso dos peixes do tratamento com *Chlorella sp* foram significativamente superiores ($p < 0,05$) após 15 dias de cultivo, quando comparadas as obtidas dos demais tratamentos que não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Quando a alimentação de juvenis de tilápia do Nilo é suplementada com microalgas, o ganho de peso é mais elevado (GARCIA et al., 2009; MOREIRA et al., 2011).

O estudo realizado pela equipe de engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará comprovou, a eficácia da microalga *Chlorella sp* na suplementação durante a larvicultura da Tilápia do Nilo, confirmando os resultados esperados com os estudos de composição centesimal da microalga, que apresentam uma elevada taxa proteico-energética que aumentou o desempenho dos peixes, enquanto o consumo pelas algas do gênero *Microcystis* e o cultivo sem alimento natural influenciaram negativamente no desenvolvimento dos animais.

Devido ao fator de biodisponibilidade, que não garante que o teor total de nutrientes presentes nos alimentos sejam completamente absorvidos pelo organismo que os consome, o teste da alimentação dos peixes pela microalga *Chlorella sp* se mostra essencial para a confirmação do potencial apresentado no presente trabalho, para garantirmos que essa grande quantidade de nutrientes seja realmente absorvida pelos peixes, testando suas respostas metabólicas inerentes a nova dieta.

Esta etapa, esta programada para ser iniciada em 2017 no LAPREBB-UTFPR, utilizando a alga como alimento in natura, sendo um suplemento com custo praticamente zero pois não passa por nenhum tratamento que onere o processo, onde assim será concluído o presente trabalho.

5.4 Análises microbiológicas

A contagem de células de microrganismos como bolores e leveduras em meio ágar foi de 4UFC/g, indicando a possibilidade de utilização da microalga *Chlorella sp* como alimento, visto que a legislação permite um valor máximo de 100 UFC/g ou 100mL. Andriguetto et al.9 citam que para uma ração ser considerada de boa qualidade, deve ter contagens de bactérias mesófilas inferiores a 6,0 UFC/g aceitável com contagens até 7,0 UFC/g e inaceitável quando apresenta contagens superiores a 8 UFC/g. Na Turquia, um estudo realizado com 24 amostras de ração para peixes demonstrou valores de mesófilos que oscilaram entre 4,10 e 4,26 UFC.g-1.

5.5 Análises estatísticas

Teste de diferenças entre médias das composições centesimais para dados **pareados** (mesma composição antes e depois)

Com o presente estudo, pretendeu-se determinar se há uma diferença significativa na composição da ração *Bottom Fish*, com o incremento de 50% da microalga *Chlorella sp*.

Queremos verificar se a média antes é menor do que a média depois; o melhor ponto de partida, que servirá para a definição da hipóteses H_0 , é que o incremento NÃO FAZ ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS, ou seja as médias antes e após a mistura são iguais (costumamos colocar em H_0 o CONTRÁRIO do que queremos provar), ou seja a DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DEVE SER SUPOSTA IGUAL A ZERO, teremos então:

$$\begin{aligned} H_0: \mu_d &= 0 \\ H_1: \mu_d &< 0 \end{aligned} \quad \text{onde } \mu_d = \mu_{\text{antes}} - \mu_{\text{depois}}$$

Foi definido um nível de significância de 1%

$$\alpha = 0,01 \quad 1 - \alpha = 0,99$$

Como no estudo a amostra tem menos que 30 elementos, a variável de teste é t_{n-1} da distribuição t de Student. Trata-se de um teste unilateral à esquerda, (com 1% de significância) e a variavel de teste é t_{n-1} (a amostra tem 5 elementos) então o valor crítico (obtido da tabela da distribuição t de Student) foi : 3,36

Para valores maiores de -3,36 aceitaremos H_0 (ou seja o incremento não faz efeito, a diferença entre as médias é nula). Se t_{n-1} for menor do que -3,36 rejeitaremos H_0 .

$$d_i = X_{antes} - X_{depois}$$

| ANALISE ESTATISTICA | | | | | |
|---------------------|-----------|----------|--------------|----------|----------|
| Composição | Proteínas | Lipídios | Carboidratos | Cinzas | umidade |
| Antes | 36 | 3,8 | 38,73333 | 11,43333 | 10,1 |
| depois | 36,3 | 12,86667 | 36 | 7,45 | 7,633333 |
| d1 | -0,3 | -9,06667 | 2,733333 | 3,983333 | 2,466667 |
| d1 ² | 0,09 | 82,20444 | 7,471111 | 15,86694 | 6,084444 |
| diferença media | -0,03667 | | | | |
| Sd | 5,284 | | | | |
| Tn-1 | -3,96 | | | | |
| Tc | -3,36 | | | | |

Conforme foi apresentado, o valor obtido para variável de -3,96, menor do que o valor crítico, fica caracterizado que o incremento de microalga *Chlorella sp* na ração *Bottom Fish*, altera a composição. O presente teste confirma uma alteração, pois há aumento significativo na quantidade de lipídios de 239,47%. Do ponto de vista prático, esta alteração se apresenta como uma melhoria, pois esta quantidade supre a dieta de ácidos graxos dos peixes de água doce (ABRAPESQ, 2014).

6. CONCLUSÃO

Os estudos físico-químicos de análise de composição centesimal, indicam um promissor potencial para a microalga *Chlorella sp* para um complemento para ração animal pisciana. Os constituintes de maior interesse foram os altos teores de proteínas presente na microalga em $36,9 \pm 0,1\%$, da sua composição, devido a sua alta necessidade para o desenvolvimento dos peixes e de lipídios com aumento de $239,47 \pm 0,23\%$.

O presente trabalho contribui para a área de produção de alimentos para animais, pois as microalgas têm grande capacidade produtiva e possivelmente podem proporcionar um produto com a mesma qualidade nutricional dos obtidos em outros alimentos, e com um custo menor.

Além disso, de grande contribuição para melhor conhecimento de algumas propriedades da microalga *Chlorella sp*, comprovando a grande capacidade de obtenção de proteínas, lipídeos e carboidratos da sua biomassa para a fins nutricionais.

A etapa de confirmação do potencial da microalga *Chlorella sp* como complemento para ração, deve consistir em testes como o realizado pela equipe de engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará, avaliando as respostas metabólicas dos peixes com o consumo da microalga, para sabermos exatamente se os nutrientes presentes em grande quantidade na microalga, serão realmente absorvidos.

REFERÊNCIAS

- ÂNGELO P. MATOS **Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella sp.*** cultivada em concentrado de dessalinização residual 2012.
- ABALDE, J. et al. **Microalgas: cultivo y aplicaciones.** 1995. 210 f. Monografias, Universidade da Coruña, España, 1995
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PSCICULTORES E PESQUEIROS **ABRAPESQ, 2014.** www.abrapesq.com.br.
- ANTELO, F. S. , COSTA, J. A. V. , *et al.* Thermal defradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal** 41(1): 4347, 2008
- AZEREDO, V. B. S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. . 2012. **171 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro , 2012.
- BAKER, R.; GUNTER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, n.15, p.484-488, 2004.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** London: Blackwell Science, 2004. p.312-351
- BECKER, E.W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology.** Cambridge: Cambridge University, 1988. p.222-256.

BENEMAN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Journal of Industrial Microbiology** v.31, n.5, 1990.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L.B. Revisão: **Biotecnologia de Microalgas**. Boletim CEPPA, v.26, n. 1, p. 9-20, 2008

BLERSCH, D.M.; KANGAS, P.C.; MULBRY, W.W. (2013). Turbulence and nutrient interactions that control benthic algal production in an engineered cultivation raceway. **Algal Research**, v. 2, p. 107-112.

BLIGH, E. G. DRYER., W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** 37: 911 – 917, 1959.

BRASIL, **MÉTODOS ANALÍTICOS OFICIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS PARA CONTRLE DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL E ÁGUA**, normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, do MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2015.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N.(1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**. v. 28, p. 3-14, 1995

BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Potencial de absorção de carbono por especies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”. **Atlantica, Rio Grande**. v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.

BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, v.5, p.21-26, 1993.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313-321, 1999.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. (2012). Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 208-214.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

COLLA, L.M. et al. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59c, p.55-59, 2004.

CONVERTI, A. E. A. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing : Process Intensification** v. 48, n. 6: 1146 - 1151, 2009.

COPLIN, L. G. **Sustainable Development of Algal Biofuels in the United States**. Washington, The National Academies Press, 2012.

CORDEIRO, R. A. G., V.M; CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M Effect of proteins from seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamaoroux on the growth of human pathogen yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49 (6): 915 – 992, 2006.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy** v.88, n. 10 : 3472 – 3480, 2011.

DERNER, R. B. E. A. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural** v. 36, n. 6: 1959 – 1967, 2006.

DUARTE, I. C. S. e Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales). 2001.148 f. **Dissertação – Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, 2001.

EMBRAPA -**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <https://embrapa.br/suinos-e-aves>, 2015.

ESTEVEES, F A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 1998, 602p.

ERIKSEN, N.T. (2008). The technology of microalgal culturing. ***Biotechnology Letters***, v. 30, p. 1525 – 1536.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; RÉZIG, S.H. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

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

GOUVEIA, L. et al. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **European Food and Research Technology**, v.222, p.362–367, 2006.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition. **Handboo of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology** ., Ames, Iowa: Blachwell Publishing: 97 – 115. 2004.

GUALTIERI, P. B., L. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology.**, CRC Press, 2006.

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

HO, S. -H., CHEN , C.-Y., LEE, D. -J., CHANG, J. -S Perspectives on microalgal CO₂ emission mitigation systems – a review. **Bioresource Advances** v.29. n.2: 189 – 198, 2011.

HO, S. -H., CHEN , C.-Y., LEE, D. -J., CHANG, J. -S. Bioethanol production using carbohydrate- rich microalgae biomass as feedstock **Bioresource Technology** 135: 191 – 198, 2013.

HOLLOWAY, T., FIORE, A., AND GALANTER HASTING, M. Intercontinental Transport of Air Pollution: Will emerging Science lead to a new hemispheric treaty? **Environmental Science and Technology** v.37: 4535 – 4542, 2003.

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

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species. : *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology **Oxford: Blackwell Science**, 2004. p.264-272

HUNTLEY, M. E. R., D.G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change** v. 12, n. 4: 573 – 608, 2007.

KRIENITZ, L. H., E. H.; HEPPELLE, D.; HUSS, V. A. R. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella*(Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Phycologia**, 2004.

KUMAR, K ., DASGUPTA, C.C., NAYAK, B., LINDBLAD, P., DAS. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**. 102: 4945 – 4953, 2011.

LEE, Y. Microalgal massa culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology** 13: 307 – 315, 2001.

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

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

MICHELON, L. K. Estudo de alternativa para separação de microalgas por eletroflotação. 2013.64 f.**Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal Do Paraná**, Curitiba, 2013)

MOLINA GRIMA, E. et al. **Downstream processing of cell- mass and products**. In: **RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.215-251

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal bio technology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. v. 20, p. 459-466, 2003

PÉREZ, H.E.B. (2007). **Biodiesel de Microalgas**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1-19.

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

RAVEN, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.: BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.331-356.

RAVEN, P.H. et al. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 906p.

REYNOLDS C. S. (2006). **Ecology of Phytoplankton** - Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge

RICHMOND, A. Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels. Terrapin Bright Green, . **Handbook of microalgais culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford, Blackweel Science: 584. 2004.

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

SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 101 (2): 87- 96, 2006.

TAKAMATSU, A. A., SAKUMA, A. C., *ET AL*. Sistema biológico automatizado para eliminação de odor das emissões gasosas de atividades comerciais poluidoras. Patente BR n. PI1003452 – 8, 13 de setembro de 2010. Brasil, 2010.

Tacon, 1993. In M.B. New, A.G.J. Tacon and I. Csavas, eds. Farm-made aquafeeds, p. 61-74. **Proceedings of the FAO/AADCP Regional Expert Consultation on Farm-Made Aquafeeds**. Bangkok, FAO-RAPA/AADCP

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. (2011). **CO₂ Fixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels**. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3071-3076.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A.(Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

TRAINOR, F.R. (1992). **Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): an ordered sequence of ecomorph development.** *Journal Phycology*, v. 28, p. 552-558.

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

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: **da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica.** *Quím. Nova*, v.27, n. 1, 2004

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

VONSHAK, A *Spirulina platensis* (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997, 252 p

WALTER, A. **Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo.** . 2011. F. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – UFPR, 2011.

XIN, L.; YING, H.H.; KE, G.; XUE, S.Y. (2010). **Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5494–5500.

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