



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
PROGRAMA REGIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E  
MEIO AMBIENTE**

**JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA**

**MICROALGAS SOB A ÓTICA DA BIOTECNOLOGIA E DE INTENÇÃO DE USO  
POPULAR EM COMUNIDADES RURAIS COM ESPÉCIES ISOLADAS DO BIOMA  
CAATINGA NOS ESTADOS DA PARAÍBA E DO RIO GRANDE DO NORTE**



**JOÃO PESSOA  
2014**

**JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA**

**MICROALGAS SOB A ÓTICA DA BIOTECNOLOGIA E DE INTENÇÃO DE USO  
POPULAR EM COMUNIDADES RURAIS COM ESPÉCIES ISOLADAS DO BIOMA  
CAATINGA NOS ESTADOS DA PARAÍBA E DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA/UEPB), em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Sassi

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilda Antonieta Salata Toscano

**JOÃO PESSOA**

**2014**

S232m Santana, Jordana Kaline da Silva.  
Microalgas sob a ótica da biotecnologia e de intenção de uso popular em comunidades rurais com espécies isoladas do bioma caatinga nos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte / Jordana Kaline da Silva Santana.- João Pessoa, 2014.  
141f. : il.  
Orientador: Roberto Sassi  
Coorientadora: Ilda Antonieta Salata Toscano  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/PRODEMA  
1. Meio ambiente - desenvolvimento. 2. Cultivo. 3. Meios alternativos. 4. Ácidos graxos. 5. Semiárido.

UFPB/BC

CDU: 504(043)

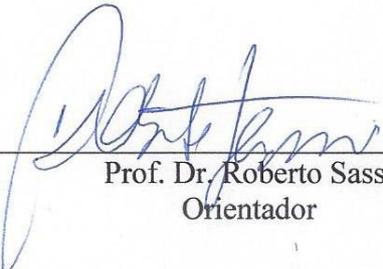
JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA

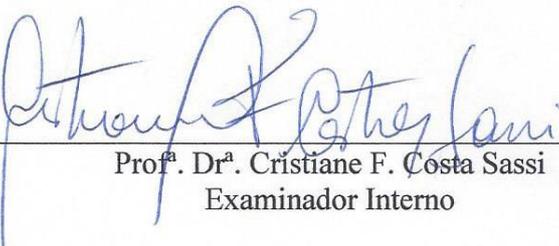
MICROALGAS SOB A ÓTICA DA BIOTECNOLOGIA E DE INTENÇÃO DE USO  
POPULAR EM COMUNIDADES RURAIS COM ESPÉCIES ISOLADAS DO BIOMA  
CAATINGA NOS ESTADOS DA PARAÍBA E DO RIO GRANDE DO NORTE

Dissertação

Dissertação Aprovada em: 30/04/2014

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Sassi  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cristiane F. Costa Sassi  
Examinador Interno

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Valéria de Oliveira Fernandes  
Examinador Externo (UFES)

*“Tudo posso Naquele que me fortalece.”*

*(Filipenses 4:13)*

*Aos meus pais, Anízio (In memoriam) e Benta e aos meus irmãos, pelo incentivo e compreensão para realização deste sonho, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, refúgio e fortaleza, por nunca me desamparar, por ter me ajudado a transpor as barreiras não me deixando desfalecer diante delas. Obrigado Senhor!

Ao meu Pai por ter me feito realizar as melhores escolhas, pela educação, pela confiança e principalmente por torcer e vibrar, à sua maneira, a cada conquista minha (Como queria que presenciasse mais esta!). Te amarei incondicional e eternamente!

À minha Mãe, pelo exemplo de mulher, força e superação incomuns a toda e qualquer pessoa que conheço, me ensinando que por maior e árdua que seja a luta, ter serenidade e confiança em Deus é primordial para ultrapassá-la. Te Amo Mãe!

Aos meus irmãos, por me fazerem acreditar no meu potencial, por serem o suporte que são, por todas as conversas, conselhos e “carões”, telefonemas e mensagens que, diariamente, fizeram da distância apenas um limite físico, pois foram e são as pessoas mais presentes em todos os momentos da minha vida. “Ainda bem que a gente tem a gente”. Muito Obrigado por Tudo. Amo vocês!

À grande Família Santana, pela torcida e por me fazer guiar pelos caminhos corretos, mostrando-me que honestidade e respeito são essenciais à vida. Amo muito todos vocês!

Ao meu Querido Orientador Prof. Dr. Roberto Sassi, pela paciência, compreensão, incentivo e transmissão de conhecimentos holísticos, virtudes estas que contribuíram imensamente para a conclusão deste trabalho. Minha gratidão é incomensurável, apenas Deus poderá retribuir tamanha dedicação. Obrigado por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, pela oportunidade de realização deste curso e ao DAAD pela concessão da bolsa.

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo Processo nº 2555/09.

Ao Laboratório de Ambiente Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), nas pessoas do Prof. Roberto e da Prof<sup>a</sup> Cristiane, pelo acolhimento, orientações e espaço laboratorial cedido para realização da pesquisa.

Ao Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES/UFG), na pessoa do Prof. Dr. Nelson, pelas análises do perfil de ácidos graxos efetuadas. Obrigado!

Ao Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC/UFES), na pessoa da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria pelas identificações taxonômicas realizadas. Obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Costa, por todas as contribuições, pelos bons exemplos e por ter me aberto às portas a pesquisa científica. Sou e serei eternamente grata!

Ao corpo docente do PRODEMA, pelas contribuições para completude de minha formação. Obrigado!

À Prof<sup>a</sup> Ilda Toscano por ter aceito o convite para Co-orientação.

À Dona Lalá e Dona Maria (*In memoriam*) pelo aconchego em sua casa, pelo colo de mãe, pela boa convivência, pela confiança. Muito Obrigado!

Aos meus estimados amigos Cris, Larisse, Géssica, Gilmara e Max, pela torcida, por estarem sempre à disposição para me ouvirem e por continuarem sendo presentes. Meu amor fraterno por vocês só aumenta!

Aos amigos e companheiros do LARBIM: Aline, Patrícia, Clediana, Viviane, Katharina, Renata, Giuseppe, Evandro, Ariane, Nathalie, Nyelson e Gabriel pela acolhida e pelo esforço dispensado à realização de minhas pesquisas. Pelos cafés e almoços juntos, pelas gargalhadas, por aguentarem meus estresses, pela troca de experiências, o que faz do laboratório um ambiente familiar, a nossa segunda casa. Essa é uma conquista conjunta, pois vocês foram fundamentais. Muito Obrigado!

Aos meus colegas de curso por terem tornado esta caminhada mais agradável, cada um marcante à sua maneira e ao Saulo por me ‘aguentar’. Muito Obrigada Queridos!

Às companheiras de moradia: Livia, Anny e Graciele, pelas experiências de vida compartilhadas, contribuindo para nosso amadurecimento e selando uma grande amizade. Obrigada meninas!

Aos técnicos do LARBIM: André, Dora, Guida, Neide e Sr. Ramos, pessoas incríveis, por atenderem aos meus pedidos, pelas conversas edificantes e cômicas. Obrigado!

Ao Prof. Airton e aos colegas do curso de inglês (JPI) pela incrível capacidade de fazer das aulas uma terapia, fundamentada na aprendizagem e boas risadas, espantando todo o estresse do dia. Obrigado!

À Prof<sup>a</sup> Viviany Pessoa, pela ajuda no tratamento dos dados e pelas aulas de estatística. Obrigada!

Ao Sr. Edmundo Barbosa, pela acessibilidade e apoio durante a realização da pesquisa. Obrigado!

À Usina Japungú, a EMPASA e a Granja pelos materiais cedidos para realização dos experimentos.

Ao Sindicato de Trabalhadores Rurais do município de Frei Martinho-PB, na pessoa de Israel Carlos, pelo acesso aos arquivos desta casa, e aos sindicalizados e conterrâneos freimartinhenses, pela disponibilidade em participar da pesquisa.

Aos queridos e eternos amigos do CES/UFCEG pela torcida. Vocês são inesquecíveis!

Às professoras pela gentileza em compor a banca.

Enfim, à todas as pessoas que torceram, incentivaram, oraram e vibraram comigo para mais esta conquista.

*Muito Obrigado!*

## Resumo

Microalgas apresentam uma composição química variada com muitos produtos de interesse à indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e setor energético, o que as tornam um grupo de elevado potencial biotecnológico. Neste trabalho foram estudadas espécies de microalgas isoladas do Bioma Caatinga do ponto de vista taxonômico, e avaliando sua capacidade de produção de ésteres metílicos de ácidos graxos mediante o cultivo das diferentes cepas em meios sintéticos. Cultivos de espécies promissoras à produção de biodiesel e de ácidos graxos essenciais também foram desenvolvidos em meios alternativos preparados com extrato de solo com vinhaça, esterco de galinha e extrato de biocomposto obtido com resíduos de hortifrutigranjeiros comercializados na EMPASA-PB. A aceitabilidade quanto ao uso de microalgas na alimentação humana e/ou animal entre trabalhadores rurais da região semiárida do estado da Paraíba foi avaliado para a espécie exótica *Spirulina platensis*. Os cultivos das espécies locais foram obtidos a partir de amostras de água coletadas em diversos ambientes aquáticos da Caatinga, inoculadas nos meios Zarrouk e WC e mantidas em câmara de cultura a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . As espécies isoladas foram codificadas e incorporadas ao Banco de Microalgas do LARBIM/UFPB, obtendo-se 24 cepas de microalgas, das quais 21 foram identificadas ao nível de espécie e 14 foram cultivadas em meios sintéticos visando à produção de biomassa e análises de ácidos graxos. Duas cepas locais D39Z (*Planktothrix isoathrix*) e D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) e uma cepa exótica D9Z (*Spirulina platensis*) foram cultivadas em meios alternativos. As curvas de crescimento foram acompanhadas por meio de contagens celulares e de medidas da fluorescência *in vivo*, em triplicatas, e todos os parâmetros de crescimento foram analisados para cada espécie testada. Biomassa de *S. platensis* cultivada em meio sintético foi usada na preparação de bolos, sucos e biscoitos utilizados na análise sensorial do teste de aceitabilidade e intenção de compra de produtos à base de *Spirulina*, do qual participaram 75 trabalhadores rurais do município de Frei Martinho-PB. Estes trabalhadores também foram avaliados quanto sua atitude frente à *S. platensis*. Diferenças nos parâmetros de crescimento foram observadas nas espécies cultivadas, sendo o valor máximo da constante de crescimento ( $k$ ) registrado na cepa D112Z (*Synechococcus nidulans*) com 0,71 divisões/dia, a maior duração da fase exponencial (8 dias) nas cepas D74Z (*Rhabdoderma lineare*) e D133WC (*Lagerheimia longiseta*) e o maior rendimento em biomassa (0,75 g/L) na cepa D28Z (*Chlorococcum cf. hypnosporum*). O maior rendimento de ácidos graxos (415,65 mg/g em relação à soja) foi registrado na cepa D115WC (*S. acuminatus*). As cepas cultivadas em meios alternativos exibiram padrões de crescimento distintos com melhores rendimentos em extrato de biocomposto. Índices de aceitabilidade de *S. platensis* superiores ao esperado (70%) foram observados para todos os atributos testados (aparência, odor e textura) nas três versões (biomassa úmida, seca e em alimentos), exceto para odor na forma “*in natura*” (66,12%). Quanto à intenção de compra, 88% dos entrevistados afirmaram que comprariam os produtos caso os encontrassem no comércio. Os testes de atitudes evidenciaram um índice de consistência interno positivo frente à *Spirulina*, indicando que os agricultores testados são abertos a inovações tecnológicas.

**Palavras-chave:** Cultivo, Meios alternativos, Ácidos graxos, Semiárido, Aceitabilidade.

## Abstract

Microalgae have a varied chemical composition with many products of interest to the food, pharmaceutical, cosmetic and energy sector, which makes them a group of high biotechnological potential. In this work some species of microalgae isolated from the Caatinga biome were studied regarding the taxonomic viewpoint and its cultivation in synthetic medium viewing to assess their ability to produce fatty acids methyl esters. Promising species for biodiesel production and essential fatty acids were also cultivable in alternative medium prepared with soil extract with vinasse, chicken manure and extract of biocompound obtained from fruits and vegetables marketed in EMPASA–PB. The acceptability for use of microalgae in human and/or animals was evaluated among agricultural workers of the semi-arid region of the state of Paraíba for the exotic species *Spirulina platensis*. Cultures of local species were obtained from water samples collected in various aquatic environments of the Caatinga inoculated in the Zarrouk and WC mediums, and maintained for growth in a culture chamber at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The isolated species were encoded and embedded in the Collection of Microalgae of the LARBIM/UFPB. A total of 24 strains of microalgae were obtained, of which 21 were identified to specific level, and 14 were grown in synthetic media to produce biomass for the fatty acids methyl esters analysis. Two local strains D39Z (*Planktothrix isothrix*) and D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) and an exotic strain D9Z (*Spirulina platensis*) were cultured in the alternative mediums. Growth curves were monitored by cell counts and measurements of the *in vivo* fluorescence, in triplicate, and all growth parameters were analyzed for each species tested. Biomass of *S. platensis* growing in synthetic medium was used for the preparation of cakes, biscuits and juices used in sensory analysis of acceptability test and purchase intent for *Spirulina*, attended by 75 agricultural workers from the city of Frei Martinho-PB. These workers were also evaluated for their attitude about *S. platensis*. Differences in growth parameters were observed in cultured species, with the maximum growth constant ( $k$ ) recorded in D112Z strain (*Synechococcus nidulans*) with  $0.71 \text{ divisions.day}^{-1}$ , the longest duration of the exponential phase (8 days) in strains D74Z (*Rhabdoderma lineare*) and D133WC (*Lagerheimia longiseta*), and the highest biomass yield ( $0.75 \text{ g/L}$ ) was registered in the strain D28Z (*Chlorococcum cf. hypnosporum*). The highest yield of fatty acids (590.8%, compared to soybean) was recorded in strain D115WC (*S. acuminatus*). Strains growing in the alternative media exhibited distinct patterns of growth with higher yields in the extract of biocompounds. Acceptability rates of *S. platensis* higher than the expected (70%) were observed for all tested attributes (appearance, odor and texture) in three versions (wet biomass, dry biomass and foods), except for odor as “in natura” (66.12%). Regarding the intention of purchase, 88% of respondents said they would buy the product if they found them in the trade. The tests showed a positive index of internal consistency in relation to the attitudes about *Spirulina*, indicating that the tested farmers are open to technological innovations.

**Keywords:** Cultive, Alternative medium, Fatty acids, Semiarid, Acceptability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para as cepas de cianobactérias cultivadas.....	68
<b>Figura 2-</b> Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para as cepas de clorofíceas cultivadas .....	69
<b>Figura 3-</b> Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para os clones de <i>Synechococcus nidulans</i> .....	70
<b>Figura 4-</b> Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para os clones de <i>Chlorococcum hypnosporum</i> .....	70
<b>Figura 5-</b> Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D9Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.....	74
<b>Figura 6-</b> Curva de crescimento por contagem celular da cepa D9Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100% .....	75
<b>Figura 7-</b> Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D39Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100% .....	76
<b>Figura 8-</b> Curva de crescimento por contagem celular da cepa D39Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100% .....	76
<b>Figura 9-</b> Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D115WC cultivada em meio sintético WC e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100% .....	78
<b>Figura 10-</b> Curva de crescimento por contagem celular da cepa D115WC cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100% .....	79
<b>Figura 11-</b> Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D9Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha .....	82
<b>Figura 12-</b> Curva de crescimento por contagem celular da cepa D9Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha .....	82
<b>Figura 13-</b> Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> (cepa D9Z) em meio Zarrouk (A), em extrato de biocomposto (B) e em extrato de esterco de galinha (C).....	83
<b>Figura 14-</b> Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D39Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha .....	84
<b>Figura 15-</b> Curva de crescimento por contagem celular da cepa D39Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha .....	84
<b>Figura 16-</b> Cultivo de <i>Planktothrix isothrix</i> (cepa D39Z) em meio Zarrouk (A), em extrato de biocomposto ) e em extrato de esterco de galinha (C) .....	85
<b>Figura 17-</b> Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D115WC em meio sintético WC e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha .....	86

<b>Figura 18-</b> Curva de crescimento por contagem celular da cepa D115WC em meio sintético WC e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.....	86
<b>Figura 19-</b> Experimento da cepa D115WC . A = em meio Zarrouk; B = extrato de biocomposto; C = extrato de esterco de galinha .....	87
<b>Figura 20-</b> Intenção de compra para <i>Spirulina</i> seca em alimento enriquecido com 10% de sua biomassa .....	94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Diferentes espécies de microalgas e suas aplicações biotecnológicas, segundo Pulz e Gross, 2004; Spolaore et al., 2006 .....	31
<b>Tabela 2-</b> Comparação entre proteína de carne bovina e proteína a partir de microalgas.....	38
<b>Tabela 3-</b> Composição do Meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) .....	41
<b>Tabela 4-</b> Composição do Meio WC (GUILLARD; LORENZEN .....	42
<b>Tabela 5-</b> Composição do Meio Erd-Schereiber (GROSS, 1937) (modificado com biocomposto) .....	43
<b>Tabela 6-</b> Padrões de avaliações microbiológicas para alimentos, conforme resolução RDC nº 12, de 2 de fevereiro de 2001 (BRASIL, 2001).....	48
<b>Tabela 7-</b> Relação microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....	52
<b>Tabela 8-</b> Constante de crescimento $k$ (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g) e totais de ésteres metílicos de ácidos graxos (g/L) das microalgas dos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....	65
<b>Tabela 9-</b> Teores de ácidos ômega 3 ( $\omega$ -3), ômega 6( $\omega$ -6), ômega 9( $\omega$ -9) e total de ômega das microalgas isoladas .....	72
<b>Tabela 10-</b> Constante de crescimento $k$ (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento celular (células.mL <sup>-1</sup> ) da cepa D39Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canal mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100% .....	77
<b>Tabela 11-</b> Constante de crescimento $k$ (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento celular (cel.ml <sup>-1</sup> .10 <sup>5</sup> ) da cepa D115WC cultivada em meio sintético WC e em meio preparado com extrato de solo do canal regado com vinhaça em diferentes concentrações .....	79
<b>Tabela 12-</b> Constante de crescimento $k$ (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L) e rendimento celular (células.mL <sup>-1</sup> ) da cepa D9Z em meio sintético Zarrouk (controle) e meio de extrato de biocomposto (EB) .....	83
<b>Tabela 13-</b> Constante de crescimento $k$ (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L) e rendimento celular (células.mL <sup>-1</sup> ) das cepa D39Z em meio sintéticos Zarrouk (controle) e meios de extratos de biocomposto (EB) e esterco de galinha (EEG) .....	85
<b>Tabela 14-</b> Constante de crescimento $k$ (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L) e rendimento celular (cel.ml <sup>-1</sup> .10 <sup>5</sup> ) da cepa D115WC em meio sintéticos WC (controle) e meios de extratos de biocomposto (EB) e esterco de galinha (EEG) .....	87
<b>Tabela 15-</b> Avaliações microbiológicas da biomassa de <i>S. platensis</i> e seu padrão microbiológico .....	91

<b>Tabela 16-</b> Valores médios dos escores para os atributos avaliados no Teste de Aceitação da <i>S. platensis</i> em suas versões “ <i>in natura</i> ”, seca e em alimento (10% de biomassa) .....	91
<b>Tabela 17-</b> Índice de aceitabilidade para a <i>S. platensis</i> em suas versões <i>natura</i> , seca e em alimento (10% de biomassa) .....	92
<b>Tabela 18-</b> Percentual de aceitação, indiferença e rejeição de <i>S. platensis</i> na versão “ <i>in natura</i> ” .....	92
<b>Tabela 19-</b> Percentual de aceitação, indiferença e rejeição da <i>S. platensis</i> na versão seca .....	93
<b>Tabela 20-</b> Percentual de aceitação, indiferença e rejeição da <i>S. platensis</i> na versão em alimentos (10% de biomassa).....	93
<b>Tabela 21-</b> Estrutura fatorial da Escala de Atitudes relacionadas com abertura a mudanças (atitude inovadora) e refratário a mudanças (atitude conservadora)	96
<b>Tabela 22-</b> Frequência (%) dos escores obtidos no teste para atitude inovadora e conservadora .....	97

## LISTA DE PRANCHAS

<b>Prancha I</b> - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....	61
<b>Prancha II</b> - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....	62
<b>Prancha III</b> - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....	63
<b>Prancha IV</b> - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....	64

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	23
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
3	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	24
3.1	<b>Importância dos estudos sobre microalgas e principais investigações sobre este tema no Bioma Caatinga</b> .....	24
3.2	<b>Alguns aspectos relacionados aos cultivos de microalgas e sua importância</b> .....	30
3.3	<b>Importância da biotecnologia das microalgas</b> .....	33
4	<b>METODOLOGIA GERAL</b> .....	41
4.1	<b>Preparação dos meios de cultura</b> .....	41
4.1.1	<b>Meios sintéticos ou definidos</b> .....	41
4.1.2	<b>Meios de cultura alternativos ou indefinidos</b> .....	42
4.1.2.1	<b>Extrato do solo de canavial regado com vinhaça</b> .....	42
4.1.2.2	<b>Extrato de Biocomposto</b> .....	43
4.1.2.3	<b>Extrato de esterco de galinha</b> .....	44
4.2	<b>Obtenção das culturas: coletas, isolamento, purificação e manutenção dos cultivos</b> .....	44
4.3	<b>Experimentos laboratoriais de crescimento e produção de biomassa nos meios sintéticos para análise de ácidos graxos</b> .....	45
4.4	<b>Cultivos em meios alternativos</b> .....	45
4.5	<b>Produção de biomassa de <i>Spirulina platensis</i> (D9Z) para teste de aceitabilidade alimentar com agricultores do semiárido paraibano</b> .....	46
4.6	<b>Acompanhamento dos cultivos</b> .....	46
4.7	<b>Análise do perfil e teor ésteres de ácidos graxos</b> .....	48
4.8	<b>Análise microbiológica</b> .....	48
4.9	<b>Taxonomia</b> .....	49
4.10	<b>Teste de aceitabilidade e intenção de compra</b> .....	49
4.11	<b>Teste de atitude</b> .....	50

4.12	Tratamento estatístico dos dados .....	51
4.13	Normatização .....	51
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1.	<b>Cultivo, taxonomia e potencialidades de aplicações biotecnológicas das microalgas isoladas .....</b>	<b>52</b>
5.1.1	Espécies isoladas .....	52
5.1.2	Detalhamento taxonômico das espécies isoladas .....	53
5.1.2.1	Cianobactérias .....	53
5.1.2.2	Clorofíceas .....	54
5.1.3	Cultivo das microalgas isoladas do Bioma Caatinga visando à produção de biomassa e análises de ácidos graxos .....	65
5.1.4	Perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos .....	67
5.2	<b>Cultivo de microalgas com potencialidade alimentar e energética utilizando meios de cultivo alternativo .....</b>	<b>73</b>
5.2.1	Cultivo em extrato de solo regado com vinhaça .....	73
5.2.2	Cultivo de microalgas em extrato de biocomposto e de esterco de galinha .....	81
5.3	<b>Aceitabilidade de <i>Spirulina platensis</i> em populações de trabalhadores rurais do semiárido paraibano .....</b>	<b>90</b>
5.3.1	Análise microbiológica da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> .....	90
5.3.2	Teste de aceitabilidade e intenção de compra .....	91
5.3.3	Teste de atitudes frente à <i>Spirulina</i> .....	95
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE A - Ficha de avaliação do teste de Aceitação e Intenção de Compra .....</b>	<b>135</b>
	<b>APÊNDICE B - Ficha do teste de avaliação de atitude inovadora e conservadora .....</b>	<b>136</b>
	<b>APÊNDICE C - Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas isoladas das dos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte .....</b>	<b>137</b>
	<b>ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>139</b>
	<b>ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética .....</b>	<b>141</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Integrando o grupo dos biomas brasileiros a Caatinga ocupa uma área de aproximadamente 969.589,4 km<sup>2</sup>, representando 11% do território nacional. Distribui-se por aproximadamente 70,6% da área territorial de todos os estados da região Nordeste e parte do norte de Minas Gerais (região Sudeste), sendo a região semiárida mais habitada do mundo. De acordo com o censo do IBGE (2000) ai vivem aproximadamente 19 milhões de pessoas, em 1.132 municípios (BARBOSA et al., 2012).

Do ponto de vista etimológico o termo caatinga quer dizer mata branca (do Tupi-Guarani: *caa* = mata + *tinga* = branca), definição esta que caracteriza bem a paisagem esbranquiçada apresentada pela vegetação durante o período seco, o que faz com que a maioria das plantas perca suas as folhas e os troncos tornem-se esbranquiçados, e de aparência seca (PRADO, 2003).

A Caatinga é um bioma endêmico do Brasil, ou seja, seu patrimônio biológico é incomum a qualquer lugar do planeta. E comparado a outros biomas brasileiros, a Caatinga apresenta muitas características extremas quando se trata de alguns parâmetros climáticos: níveis elevados de radiação solar, de temperatura média anual e de potencial de evapotranspiração, e níveis baixos de nebulosidade, de taxas de umidade relativa e de precipitações, não só baixas, mas irregulares e limitadas, em grande parte da área, a um período muito curto no ano (REIS, 1976). Estas características propiciam a ocorrência de cheias e secas, sendo que as secas apresentam períodos mais prolongados e /ou indefinidos, fazendo da água um fator limitante. Estes fenômenos modelam a vida da fauna e da flora local, ou seja, a caatinga abriga espécies que se adaptaram morfofisiologicamente às condições locais, ressaltando a sua importância biológica.

Do ponto de vista climatológico, a região é marcada por apresentar baixos índices pluviométricos (menos que 1000 mm por ano, com algumas áreas recebendo menos que 500 mm por ano), e com taxas de evaporação da ordem de 1150 mm por ano. O padrão de precipitação é irregular, com secas frequentes que podem durar até 11 meses (NIMER, 1977). Não é surpreendente, portanto, que a disponibilidade hídrica exerça um papel importante para a sobrevivência das pessoas que ali vivem, e que precisam sobreviver com períodos prolongados de escassez de água. A maioria dos rios e nascentes apresentam fluxos intermitentes (MALTCHIK; MEDEIROS, 2006; MEDEIROS; MALTCHIK, 2001), mas exercem importante papel nas estratégias de sobrevivência das populações humanas nessa região (MALTCHIK et al., 2009).

Ao passo em que a Caatinga apresenta características que lhe são peculiares esse ecossistema é também marcado pela exploração humana, devido ao desenvolvimento de práticas agrícolas e extrativistas (alimentação de animais e comércio de madeira) com desmatamento e queimadas intensas, que contribuem imensamente para sua degradação, e para a impressão e/ou associação que algumas pessoas fazem do bioma: pobre, seco, sem vida e marcado por sofrimento. Esta visão em grande parte se dá diante da escassez de pesquisas sobre a Caatinga, colocando-a em um cenário de importância do ponto de vista conservacionista, por enaltecer a sua biodiversidade, já que muitas espécies são registradas apenas neste bioma.

No tocante ao grupo das microalgas, Bicudo e Menezes (2001) destacam que a Caatinga está entre os biomas menos conhecidos, juntamente com o Pantanal e o Pampa. Estes autores referem apenas 2 espécies de Euglenophyceae, 2 de Bacillariophyceae, 11 de Cyanophyceae e 22 de Chlorophyceae para a Caatinga, quantidade esta que totaliza 37 espécies, ou seja cerca de 1% da 3.689 espécies epicontinentais estimadas por estes autores para o Brasil.

Ressalta-se evidentemente que a compilação de Bicudo e Menezes (2001) sobre as microalgas da caatinga não representa a realidade deste Bioma, visto que os dados que eles apresentaram não esgotaram toda a literatura disponível. Entretanto, mesmo com carência de informações, torna-se evidente que o que eles sinalizam é a necessidade urgente de um maior número de pesquisas sobre as microalgas, especialmente para as áreas que consideram menos conhecidas, como a caatinga, o pampa e o pantanal.

E foi pensando nesta escassez de informações que se planejou este trabalho. A literatura tem reportado poucos estudos envolvendo o grupo das microalgas com foco na identificação taxonômica de espécies ocorrentes no bioma Caatinga (AFFE, 2012; ALCÂNTARA et al., 2011; CAMPELO et al., 2002; CHELLAPPA, 2007; COSTA; DANTAS, 2011; DANTAS et al., 2008; LEÃO, 2004; MASCARENHAS et al., 2013; MENDES et al., 2002; MENDES-CÂMARA et al., 2002; MENDONÇA, 2009; PEREIRA et al., 2011; PESSOA et al., 1997; RAMOS et al., 2012; RANGEL et al., 2013; SILVA, 2009; VANDERLEI, 2013). E nenhum estudo tem enfatizado o cultivo de microalgas dessa região com foco no seu potencial biotecnológico, o que destaca o caráter pioneiro desta pesquisa, cujo propósito é também contribuir com o inventário taxonômico das espécies que habita os diferentes tipos de ambientes aquáticos desse Bioma.

São muitos os aspectos que viabilizam o cultivo de microalgas: elas podem ser cultivadas em áreas inadequadas à agricultura tradicional; os cultivos em massa podem ser

desenvolvidos em pequenos espaços; apresentam produção contínua durante o ano; praticamente não geram danos ambientais; quando realizados em larga escala representam uma prática sustentável e tem importância social, podendo gerar emprego e renda; possuem necessidades reduzidas de nutrientes; podem ser desenvolvidos independentemente das mudanças sazonais, não competindo, portanto, com os usos da terra para agricultura; e podem usar águas residuais como meio de cultura (MATA et al., 2010).

No Brasil, o cultivo em massa de microalgas é um campo de investigação bastante promissor e necessita de mais atenção. Considerando-se a existência de regiões com condições climáticas potencialmente adequadas, com temperaturas amenas e sol em abundância, sua prática parece ser uma possibilidade socioeconômica muito promissora particularmente na região Nordeste.

Através do conhecimento das espécies, que se dá a partir de seu isolamento e cultivo, é possível usar as condições climáticas propiciadas pelo Bioma Caatinga a favor do desenvolvimento de cultivos em larga escala com espécies resistentes, ou seja, já adaptadas às condições locais, e que apresentam diversos potenciais para usos biotecnológicos, ou ainda visando à implantação de cultivos artesanais em comunidades rurais para subsidiar a alimentação humana ou animal em períodos de escassez de água, como mais uma alternativa de geração de emprego, de renda e de sobrevivência na seca. Se tais cultivos forem manejados de forma sustentável podem vir a se tornar em mais uma alternativa para o desenvolvimento da região, quer seja para a produção de alimento ou de energia.

A seleção de espécies de alto potencial biotecnológico é um aspecto importante a considerar, pois pode levar à redução de custos no processo produtivo. Isso justifica a necessidade de estudos das espécies locais visto que uma grande variedade de microalgas ainda não foi explorada e dentre as cerca de 200 mil espécies conhecidas, a maioria permanece bioquímica e metabolicamente inexplorada (SHEEHAN et al., 1998).

Microalgas ocorrem em todos os ecossistemas da terra, não somente nos aquáticos, mas também terrestres, e englobam uma grande variedade de espécies que vivem em condições ambientais amplamente variáveis (MATA et al., 2010). Elas fixam CO<sub>2</sub> da atmosfera através do processo da fotossíntese e suas taxas são, até, 10 vezes superiores à das plantas terrestres (USUI; IKENOUCI, 1997).

O uso de microalgas para a produção de biodiesel tem ganhado destaque nos últimos anos e resíduos gerados da produção de biodiesel a partir das microalgas podem se constituir em importante fonte de material proteico e outras substâncias nutricionais, podendo ser utilizados como suplemento alimentar de baixo custo para alimentação humana ou produção

de ração animal. Citam-se como exemplos, a produção de etanol, metano, alimento para gado, fertilizante orgânico (devido à sua alta relação N:P), ou simplesmente, a biomassa remanescente pode ser queimada para a co-geração de energia (WANG et al., 2008).

A quantidade de lipídeos que algumas espécies já estudadas podem conter chega a representar até 75-80% da biomassa seca, dependendo da espécie e do estado fisiológico em que ela se encontra. Chisti (2007) aponta que a espécie *Botryococcus braunii* pode conter de 25 a 75% de lipídeos, *Chlorella* sp. apresenta de 28 a 32%, *Phaeodactylum tricornutum*, de 20 a 30%, *Schizochytrium* sp de 50 a 77% e *Neochloris oleoabundans* de 35 a 54%. Esta riqueza em teores lipídicos sugere uma grande diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos em muitas microalgas, o que é de relevante interesse para a indústria farmacêutica, alimentar e de cosméticos.

O domínio de técnicas de produção de concentrados algáceos a partir de culturas de microalgas também poderá abrir novos campo de investigações acerca de compostos bioativos de importância econômica, particularmente sobre antioxidantes como a astaxantina, e corantes naturais como a ficoeritrina, ficocianina e clorofila.

Hoje, diversas unidades de cultivo em massa de microalgas foram implantadas em diversos países como o México, Estados Unidos, Japão, Austrália, Índia e Cuba, sendo que a produção desses países vem aumentando expressivamente a cada ano e isso deverá também chegar ao Brasil muito em breve.

Considerando-se as condições climáticas favoráveis, com temperaturas amenas e sol em abundância, a região nordeste do Brasil tem condições excepcionais para a implantação de sistemas produtivos de cultivo em massa de microalgas com elevado potencial biotecnológico ou para fins alimentares (fonte de proteína). O desenvolvimento de técnicas de cultivo usando meios alternativos elaborados a partir de resíduos da produção agropecuária ou industrial poderá, inclusive, despertar o interesse quanto ao uso popular de biomassa de microalgas em comunidades rurais.

Na Caatinga, em especial, pesquisas com este propósito se tornam deveras importante, visto que os resultados poderão abrir novos horizontes no tocante às estratégias de sobrevivência com a seca, especialmente quanto à possibilidade de se obter, de forma rápida e segura, grandes quantidades de proteína para consumo humano ou alimentação animal em épocas de escassez hídrica, uma vez que as necessidades hídricas para produção de biomassa de microalgas é mínima quando comparadas à agricultura tradicional. Nos cultivos em tanques a evaporação pode ser minimizada mediante o uso de cobertura com materiais transparentes, a exemplo de filmes de policarbonatos, e em sistemas fechados

(fotobiorreatores) o consumo de água é mínimo visto que praticamente não há perdas. Despertar este interesse em comunidades rurais da região semiárida brasileira é, entretanto, um novo desafio, visto que isso implica em avaliar a possibilidade de aceitação ou de rejeição de tais tecnologias e do uso de microalgas nessas comunidades, sendo este mais um foco inovador desta pesquisa.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial de produção de óleos para fins de biodiesel e de aceitabilidade para alimentação humana em comunidades rurais de espécies de microalgas provenientes de ambientes aquáticos do Bioma Caatinga.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Coletar, isolar e manter em cultivos unialgais espécies de microalgas em diferentes ambientes aquáticos do Bioma Caatinga nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte;
- b) Contribuir com o inventário taxonômico das espécies de microalgas do Bioma Caatinga nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte;
- c) avaliar a produção e a diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos nas espécies isoladas do bioma Caatinga cultivadas em condições laboratoriais controladas, como subsídio à produção de biodiesel ou para fins nutracêuticos;
- d) avaliar o crescimento de espécies de microalgas isoladas do bioma Caatinga potencialmente produtoras de ácidos graxos, e de microalga com alto potencial de produção de proteínas, em meios de cultura alternativos;
- e) medir a aceitabilidade de uso de microalgas como complemento alimentar em população de trabalhadores rurais da região semiárida do Estado da Paraíba;
- f) avaliar se o grau de abertura dos trabalhadores rurais da região semiárida do Estado da Paraíba frente à utilização de tecnologia de produção de microalgas para fins alimentares se manifesta como atitudes inovadora ou conservadora.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Importância dos estudos sobre microalgas e principais investigações sobre este tema no Bioma Caatinga

Microalga é uma denominação geral aplicada a uma vasta gama de microrganismos pertencentes a diversos grupos taxonômicos que não guardam entre si nenhuma relação filogenética, e que incluem até mesmo formas procarióticas a exemplo das cianobactérias. Segundo Margulis e Schwartz (2001), as microalgas eucariotas pertencem ao Reino Protoctista, Super-Reino Eucária, que integram todos os organismos que evoluíram por simbiogênese, enquanto que as cianobactérias fotossintetizantes integram o sub-reino Eubacteria, do Reino Bacteria, Super-Reino Prokaria, que integram todos os organismos que evoluíram sem simbiogênese.

Tais organismos apresentam forma e tamanho variados, medindo desde alguns micrômetros até alguns milímetros, e colonizam diferentes tipos de ambientes, podendo viver como seres planctônicos ou sobre diferentes tipos de substratos. Algumas microalgas podem ocorrer como epífitas, epipélicas, endotélicas, epipsâmicas, endopsâmicas, enquanto outras ainda são encontradas como epi ou endossimbiontes de diversos invertebrados aquáticos, a exemplo dos cnidários, poríferas, tunicados, esponjas, dentre outros. Essa grande variedade de habitats que podem colonizar faz das microalgas organismos ubíquos, visto que eles podem ser encontrados até mesmo em rochas e areias dessecadas no deserto, bem como em áreas montanhosas cobertas de neve, em ambientes hipersalinos, e até mesmo em fontes termais.

Segundo Derner et al. (2006) as microalgas se distribuem entre as Divisões Cyanophyta (cianobactérias) como procarióticas e as Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta como eucarióticas.

Cada Divisão caracteriza-se por apresentar diferentes tipos de pigmentos, sendo tal aspecto uma das principais características usadas para separar os diferentes grupos de microalgas. É certo que todas possuem clorofila-a, mas juntamente com ela outros pigmentos acessórios estão presentes e auxiliam na fotossíntese, a exemplo das xantofilas, carotenós, ficocianinas e ficoeritrina. As cianobactérias (Divisão Cyanophyta), por exemplo, por serem procariotas não possuem núcleo organizado, nem mitocôndria e nem cloroplastos, mas contém clorofila-a e outros pigmentos acessórios característicos, como ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina, organizados em tilacóides e responsáveis pela coloração verde-

azulada característica do grupo (LORENZI, 2008). As clorófitas (Divisão Chlorophyta), por sua vez, que integram um grupo muito diversificado encontrado predominantemente em ambientes dulcícolas, possuem clorofila a e b e algumas vezes, carotenoides, enquanto que as diatomáceas (Bacillariophyceae), muito abundantes e diversificadas no ambiente marinho, contêm clorofila-a e c e carotenóides (xantofilas, dentre as quais a mais abundante é a fucoxantina e o caroteno), enquanto que os dinoflagelados (Divisão Dynophyta ou Pyrrophyta) também predominantemente marinhos, contêm clorofila-a e c associados com caroteno e xantofilas, das quais a mais abundante delas é a peridina (BOUGIS, 1976).

Mundialmente, as microalgas contribuem com uma parcela expressiva da biodiversidade global, muito embora o número exato de espécies ainda permaneça desconhecido (DERNER et al., 2006). Dados da literatura mostram que podem existir de 30.000 a um milhão de espécies descritas e algumas estimativas reportam mais de 200.000 espécies apenas para as Bacillariophyceae (GUIRY, 2012), dados estes que contrastam com as 8000-10000 espécies descritas para este grupo (ARMBRUST, 2009). As cianobactérias representam os organismos fotoautotróficos mais antigos, visto que surgiram no planeta Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos e foram indispensáveis para a conversão da atmosfera primitiva à atual, sendo que o grupo abriga cerca de 150 gêneros, dos quais 40 são potencialmente tóxicos (FERREIRA, 2008).

Nos ambientes aquáticos as microalgas desempenham um papel preponderante, visto que, por serem organismos fotossintetizantes, disponibilizam o uso do carbono para as cadeias alimentares utilizando a luz solar até os limites da zona eufótica para a produção orgânica. A dinâmica e a estrutura das comunidades de microalgas que integram as populações planctônicas dependem da disponibilidade dos nutrientes presentes na coluna d'água, particularmente de nitrogênio, fósforo, sílica e ferro, sendo estes os principais componentes que regulam a produtividade primária nos oceanos, em lagos, reservatórios e ambientes estuarinos. Usualmente, a dinâmica de crescimento do fitoplâncton é previsível, muito embora possa acontecer crescimento explosivo de algumas espécies em determinadas situações, formando florações que persistem por vários dias, e que se distribuem formando manchas na superfície da água visíveis a distância, inclusive através de imagens de satélite, dependendo da escala com que se desenvolvem.

Muitas dessas florações podem ser produzidas por microalgas tóxicas, representando este fato uma grande preocupação mundial devido à capacidade que tais organismos apresentam para produzir e liberar toxinas como metabólitos secundários, que podem ser letais para muitos seres vivos, incluindo o homem, além dos efeitos que tais florações podem

causar no equilíbrio dos ecossistemas. Dentre as microalgas capazes de formar florações tóxicas destacam-se os dinoflagelados e as cianobactérias, que produzem potentes toxinas com ações neurotóxicas, hepatóxicas, dermatotóxicas, e aquelas caracterizadas como inibidores potentes de síntese proteica (YUNES et al., 2003). As neurotoxinas apresentam uma ação rápida em vertebrados, através de diferentes mecanismos fisiológicos, causando a morte por parada respiratória, sendo as saxitoxinas um grupo de neurotoxinas comumente observadas em dinoflagelados marinhos responsáveis pelo fenômeno das marés vermelhas. As hepatoxinas, apresentando mecanismo de ação mais lenta, também podem causar a morte de vertebrados em horas ou dias (CARMICHAEL, 1994), e dentre elas destacam-se as microcistinas, que apresentam a maior quantidade de registros no Brasil, especialmente em reservatórios utilizados para o abastecimento público (SASSI, 2013).

A diazotrofia no meio aquático é outra característica importante das cianobactérias, visto que a fixação do nitrogênio realizada por tais microalgas é globalmente o mais importante processo depois da fixação do CO<sub>2</sub> pela fotossíntese (GENUÁRIO, 2010). Tal processo tem um papel significativo na produção de novo nitrogênio bem como na produção primária no ambiente marinho (HERBERT, 1999) o que faz das cianobactérias um dos mais importantes grupos de microalgas nos diversos oceanos e mares oligotróficos do mundo (SASSI, 2013).

A taxonomia das microalgas é outro aspecto que merece menção, visto que é extremamente complexa, dependendo do grupo. Nos dinoflagelados tecados, por exemplo, além do tamanho e de estruturas como apêndices e chifres, ela se baseia no número, na posição e na geometria das placas tecais, sulcais e cingulares que revestem a parede celular e cuja constituição química é de natureza celulósica. A taxonomia requer a remoção do conteúdo citoplasmático com gotas de hipoclorito de sódio, expondo com mais nitidez os detalhes e as formas de cada uma dessas placas, que podem ser facilmente visualizadas em microscopia óptica, muito embora o uso da microscopia eletrônica tenha se tornado cada vez mais comum, permitindo a visualização de outros detalhes mais delicados. Nos dinoflagelados nus, ou atecados, usualmente a taxonomia é baseada na forma e na posição das regiões sulcal e cingular em relação ao eixo apical, no tamanho da célula, na natureza do anfiema, e na forma geral da célula, além de caracteres ultraestruturais, visíveis em microscopia eletrônica.

As diatomáceas, por sua vez, tem sua classificação essencialmente baseada nas características da frústula, uma estrutura silicosa que reveste a parede celular e que apresenta distintos formatos e detalhes que são peculiares a cada espécie, a exemplo de aréolas, poros,

poróides, processos terminais como chifres, espinhos, setas, comuns na Ordem Centrales, além de estrias, rafe, pseudorafe, costelas, entre outros, na Ordem Pennales. O estudo dessas características requer a limpeza das frústulas mediante o uso de agentes oxidantes como água oxigenada, ácido sulfúrico, permanganato de potássio ou hipoclorito de sódio, por exemplo, que removem o conteúdo celular e evidenciam todos os caracteres das valvas (epivalva e hipovalva), da região perivalvar e do manto, que em seu conjunto constituem a frústula, tornando mais facilmente visíveis os caracteres usados para a identificação das espécies, inclusive nas formas muito diminutas que necessitam de microscopia eletrônica.

Nas cianobactérias a taxonomia adota tanto o seguimento botânico tradicional como o bacteriológico de maneira que tanto o código bacteriológico como o código botânico é empregado (OREN, 2004; OREN; TINDALL, 2005). A taxonomia botânica tradicional baseia-se em caracteres morfológicos e ecológicos (DESIKACHARY, 1959; GEITLER, 1932; LANE et al., 1985) e comumente este método tem sido usado em diferentes biótopos evidenciando a enorme variabilidade morfológica do grupo e os detalhes da sua distribuição geográfica, como se faz em estudos florísticos. No entanto, frente à escassez de informações sobre relações filogenéticas nas cianobactérias, tais estudos são considerados pouco populares na pesquisa moderna ficológica, conforme ressalta Komarék (2006). Na taxonomia do grupo cada vez mais se consideram informações genéticas além da morfologia e de caracteres citológicos, ecológicos e bioquímicos (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).

Usualmente, a taxonomia das bactérias está baseada na morfologia da célula e forma da bainha, reprodução, formação de colônia, pigmentação, fisiologia e bioquímica, bem como na organização da estrutura celular a partir de microscopia eletrônica (critérios botânicos), juntamente com análises bioquímicas da composição da parede celular e estrutura dos ribossomos, que revelam a natureza procariótica das células e justificam o posicionamento do grupo junto às bactérias Gram-negativas (BONEN; DOOLITTLE, 1978; RIPPKA, 1988; STANIER et al., 1971; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) e sua inserção no Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana.

Na atualidade, os dois sistemas de identificação das cianobactérias tem sido rotineiramente usados visto que a sistemática das espécies deste grupo não deve basear-se somente nos métodos tradicionais da Botânica (ZERHR et al., 1997). A utilização de características fenotípicas juntamente com detalhes genotípicos certamente deverá tornar mais robusta a taxonomia das espécies de cianobactérias (MARQUARDT; PALINSKA, 2007; RAJANIEMI et al., 2005; SWILMOTTE; HERDMAN, 2001; ZEHR et al., 2003). Entretanto, mesmo com a adoção da taxonomia molecular usualmente adotada para as bactérias, não é

simples estabelecer consistentes relações taxonômicas e filogenéticas nas cianobactérias, em função da pequena quantidade de características consistentes para suportar um bom esquema taxonômico, seja este pelo sistema nomenclatural bacteriano ou botânico (FIORE et al., 2007; HENSON et al., 2002; RIPPKA et al., 1979; STAINIER et al., 1978), em função do que se percebe que a sistemática das cianobactérias deverá continuar sendo ainda extremamente confusa, devendo este dilema perdurar por muito tempo nas discussões entre botânicos e microbiologistas (GENUÁRIO, 2010).

Todos esses aspectos acima relacionados são suficientes para ressaltar a importância dos estudos sobre microalgas. Mas além dos aspectos ecológicos relacionados com a produtividade primária nos ecossistemas aquáticos e o ciclo do carbono ou das florações tóxicas, cada vez mais frequentes tanto nos oceanos como nos ecossistemas epicontinentais, ou ainda, dos aspectos inerentes à taxonomia e relações filogenéticas nos diferentes grupos de microalgas, chama a atenção, na atualidade, a relevância que muitas espécies deste grupo de microrganismos apresentam para a biotecnologia. Neste contexto, diversos aspectos relacionados com os requisitos de crescimento de células em cultivo, estratégias adaptativas e morfologia funcional de inúmeras espécies marinhas e de água doce tem sido objeto de investigação recente.

Como a maioria das microalgas são fotoautotróficas, obtém-se bom crescimento das células desde que existam condições térmicas, fóticas e nutricionais adequadas ao seu desenvolvimento. O elevado crescimento das células em cultivo é consequência da elevada relação superfície/volume que esses organismos apresentam, além da sua capacidade de se reproduzirem assexuadamente.

A produção de microalgas é um importante mecanismo natural para reduzir o excesso de CO<sub>2</sub> atmosférico por biofixação, assegurando uma diminuição no efeito de estufa, amenizando o aquecimento global e as mudanças climáticas em nível mundial, e garantindo um desenvolvimento sustentável e uma melhor gestão dos recursos naturais. Além disso, desde que são cultivadas de forma contínua e em curto tempo, requerendo pequenas áreas para seu cultivo e cuidados simples como reposição de nutrientes, controle de pH, luminosidade (BERTOLDI et al., 2008), torna-se evidente que os cultivos de microalgas apresentam inúmeras vantagens sobre a agricultura convencional, visto que podem atingir uma produtividade maior do que as culturas tradicionais, além de poder ser desenvolvido em áreas com climas limitantes para a prática agrícola e utilizarem pouquíssima quantidade de água. (LOURENÇO, 2006; MATA et al., 2010; SPOLAORE et al., 2006). Por outro lado, a biomassa produzida pode ser utilizada tanto como alimento, energia ou como fonte de

compostos bioativos de interesse (CHISTI, 2010; RADMANN; COSTA, 2008) aspectos estes que colocam as microalgas na vanguarda das pesquisas em biotecnologia de ponta.

No tocante aos estudos sobre microalgas realizados no bioma caatinga, deve-se destacar a escassez de informações taxonômicas para esta região (BICUDO; MENEZES, 2010), fato este que por si só já é muito relevante. Tradicionalmente, as pesquisas realizadas com microalgas neste bioma têm enfatizado principalmente aspectos ecológicos sobre o fitoplâncton e perifíton e presença de cianobactérias relacionadas com algumas características limnológicas, principalmente em açudes.

Dentre esses estudos podem ser destacados os trabalhos de Falcão et al. (1999), que estudaram a composição florística da comunidade fitoplanctônica em reservatórios de cinco bacias hidrográficas do Estado de Pernambuco e relacionaram a presença das cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis* com algumas características limnológicas e a dominância das demais classes, sendo as clorofíceas as de maior diversidade; Bouvy et al. (1999), que estudaram a influência dos fatores abióticos sobre a comunidade fitoplanctônica no reservatório Mundaú, PE, em curtos intervalos amostrais; Bouvy et al. (2001) que estudaram os efeitos de uma floração da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* no reservatório Ingazeira, PI; Mendes-Câmara et al. (2002) que identificaram a ficoflórula planctônica do rio Parnaíba, PI; Chellappa e Costa (2003) que estudaram aspectos ecológicos das cianobactérias no reservatório Gargalheira em Acari, RN, enfatizando aspectos do ciclo anual; Costa et al. (2006) que relataram a ocorrência de florescimentos de cianobactérias e a presença de cianotoxinas em amostras de água do reservatório Armando Ribeiro Gonçalves, RN; Panosso et al. (2007), que estudaram as cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*); Andrade (2008) que avaliou a dinâmica do fitoplâncton, qualidade de água e a percepção de pescadores em açudes da bacia do rio Taperoá, PB; Araújo (2009), que estudou o efeito do enriquecimento com nutrientes (N e P) em diferentes condições de luz sobre o crescimento do fitoplâncton no reservatório eutrófico Engenheiro Armando Ribeiro Gonçalves, bacia hidrográfica do Rio Piranhas/Açu, RN, região semiárida; e Vasconcelos et al. (2011) que estudaram as cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba enfatizando aspectos da ocorrência, toxicidade e fatores reguladores.

Outros trabalhos recentes foram desenvolvidos por Lima (2009) no Riacho Avelós, PB, margem direita do rio Taperoá, microrregião homogênea dos Cariris Velhos, PB, mediante estudo da colonização fitoplâncton, perifíton e cianobactérias em substrato artificial, avaliando a estrutura da comunidade em dois períodos (seca e chuva) do ciclo anual. Macêdo

(2009), realizou estudo sobre a presença de microcistina em 20 reservatórios de abastecimento público do estado da Paraíba dos quais 17 estão inseridos no bioma Caatinga e 3 na zona da Mata.

### **3.2 Alguns aspectos relacionados aos cultivos de microalgas e sua importância**

Historicamente, o primeiro cultivo monoespecífico de microalgas foi obtido por Beijerinck in 1890 com *Chlorella vulgaris*, e os primeiros estudos fisiológicos empregando essas culturas foram realizados por Warburg, por volta de 1900. Mas foi somente por volta de 1950 que os cultivos em massa desses organismos começaram a receber mais atenção. O livro clássico de Burlew (1953) procurou sumarizar o conhecimento a respeito na época, e a partir de então o interesse nos cultivos de microalgas tem crescido continuamente e muitos aspectos da biotecnologia foram desenvolvidos visando aumentar a eficiência de culturas em massa (BENEMANN et al., 1987; CHAUMONT, 1993; RICHMOND, 1986, 1987).

A literatura que trata dos estudos sobre cultivos de microalgas é muito vasta, demonstrando que o tema vem de longo tempo recebendo a atenção de pesquisadores no mundo todo, elas têm uma significativa importância comercial porque muitas delas podem ser não somente fonte de alimento para animais e humanos, mas também fontes de uma grande variedade de produtos químicos usados em diversas atividades industriais, inclusive na tecnologia de alimentos e na indústria farmacêutica (BOROWITZKA, 1999a UKELESS, 1976). Microalgas fornecem proteínas, pigmentos carotenóides, agentes anti-oxidantes e lipídios que podem ser usados na produção de energia (DEL CAMPO et al., 2007). Mas também podem ser usadas diretamente em inúmeros processos tecnológicos como no tratamento de águas residuárias e em projetos de MDL (Mecanismo de Desenvolvimento Limpo) que hoje se constituem no principal mecanismo mundialmente adotado para reduzir as emissões de CO<sub>2</sub> na atmosfera e minimizar os efeitos do aquecimento global.

A obtenção de biomassa a partir de cultivos intensivos de microalgas é um importante processo biotecnológico que se acha em expansão, visto que a partir desses cultivos é possível obter energia, alimento e vários produtos de interesse nutricional, farmacológico e industrial (Tabela 1), a custos que podem ser muito inferiores do que aqueles empregados pela agricultura tradicional, e numa velocidade de produção muito mais rápida (<http://www.spirulinaresource.com/earthfoodintro.html>; LOURENÇO, 2006; SPOLAORE et al., 2006).

**Tabela 1** – Diferentes espécies de microalgas e suas aplicações biotecnológicas, segundo Pulz e Gross, 2004; Spolaore et al., 2006.

<b>Espécie</b>	<b>Produto</b>	<b>Área de aplicação</b>
<i>Arthrospira</i> sp. ( <i>Spirulina</i> )	Ácido $\gamma$ -linolênico (GLA)	Suplemento alimentar, alimentação para nutrízes.
<i>Spirulina platensis</i>	Biomassa, ficocianina	Alimento natural, alimentação humana e animal, suplemento alimentar, cosméticos.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa	Alimento natural, alimentação humana e animal, suplemento alimentar, aquicultura e cosméticos.
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenóides, $\beta$ -caroteno	Alimento natural, alimentação humana e animal, suplemento alimentar, cosméticos.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenóides, astaxantina	Produtos farmacêuticos, aditivo alimentar (corante natural).
<i>Odontella aurita</i>	Ácidos graxos	Produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentação para nutrízes.
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polissacarídeo, ácido aracdônico (AA)	Produtos farmacêuticos cosméticos, alimentação animal.
<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos graxos	Alimentação animal.
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Lípideos, ácidos graxos	Alimentação animal, biocombustível.
<i>Lyngbya majuscula</i>	Imunomoduladores	Produtos farmacêuticos e alimentação animal.
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	Suplemento nutricional e aquicultura.
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Biomassa	Alimentação animal, cosméticos.

Os estudos com esses organismos têm enfatizado as mais diversas abordagens, contemplando diversas áreas do conhecimento, incluindo a fotossíntese, toxicidade, fatores promotores e inibidores de crescimento, compostos nutricionais limitantes, tolerância de espécies à dessecação e escuridão de células vegetativas e esporos de resistência, excreção e absorção de compostos, entre outros (BERLAND et al., 1973; CLEVELAND; PERRY, 1987; HARGRAVES; FRENCH, 1975; LOMBARDI, 1990; MARTIN-JEZEQUEL, 1983; NAKANISHI; MONSI, 1965; POULET; MYKLESTAD et al., 1972; QUARMBY et al., 1982; RAIMBAULT, 1984; 1986).

Os efeitos das condições fóticas sobre os cultivos (FAWLEY, 1984; GRIFFTHS, 1973; QURAIISHI; SPENCER, 1971; SAVIDGE, 1986), da temperatura (GOLDMAN, 1977; GOLDMAN; MANN, 1980; MORRIS; CLOVER, 1974; RAIMBAULT, 1984; 1986), da salinidade (BLINN, 1984; BRAND, 1984; SCHOBERT, 1980; SHIMURA et al., 1979), da absorção de compostos nitrogenados (CRESSWELL; SYRETT, 1979; RAIMBAULT, 1984), do uso de guanina por microalgas (SHAH; SYRETT, 1982), da absorção de aminoácidos (FLYNN; SYRETT, 1985, 1986a,b), amônia (GOLDMAN; GLIBERT, 1982), bem como sobre a excreção de compostos orgânicos durante o desenvolvimento dos cultivos (RAIMBAULT, 1986) são outros exemplos.

A aplicação dos cultivos de microalgas na aquicultura é outra linha que merece destaque, principalmente quanto ao uso desses organismos para alimentação de larvas de moluscos, crustáceos e peixes (BAGES et al., 1978; BEM-AMOTZ et al., 1987;

GUILLARD, 1975; OKAUCHI; HIRANO, 1986; SCOTT; BAYNES, 1978; SIMON, 1978; WALNE, 1970). Neste contexto, também foram realizados estudos sobre a composição química, das microalgas visando sua aplicabilidade à alimentação de animais em cativeiro (BROWN, 1991; BROWN et al., 1997, 1998; CAERS et al., 1999; LOPES-MUÑOZ et al., 1992; O'CONNOR et al. 1992; SOUTHGATE et al., 1998; WHYTE, 1987). Variações na constituição química das microalgas em diferentes condições de cultivos (AFONSO, 1986; ANTIA, 1977; FABREGAS et al., 1984, 1985, 1987; FIDALGO et al., 1998; GOLDMAN, 1980; LOURENÇO et al., 1997; OJEDA; NELSON et al., 1992; SAUODIS-HELIS et al., 1999; SUKENIK et al., 1993; VALENZUELA-ESPINOZA et al., 2002; WIKFORS, 1986) também tem sido conduzidos, além de outros estudos ecológicos diversos, envolvendo relações interespecíficas (GOLDMAN; RYTHER, 1976; GOLDMAN et al., 1982; RIJSTENBIL, 1988).

No Brasil grande parte das pesquisas sobre este tema tem sido direcionada a estudos laboratoriais em condições controladas, principalmente sobre aspectos metodológicos (VIEIRA, 1975, 1977), ecológicos e eco-fisiológicos (AIDAR, 1980; GAETA, 1985; SANTOS et al., 2003; SIGAUD, 1990; TEIXEIRA; VIEIRA, 1976; TEIXEIRA et al., 1986; VIEIRA; TUNDISI, 1978; VIEIRA, 1980; YONESHIGUE BRAGA, 1971); uso de meios alternativos (CASTRO, 1979; GONZALEZ-RODRIGUEZ; MAESTRINI, 1983; KOENING, 1984; MELO et al., 1993; OLIVEIRA; TRIANI et al., 1984, 1986; OLIVEIRA, 1988) e análises bioquímicas (KOENING et al., 1990b, LOURENÇO et al., 1997; TALAMONI et al., 1988) e alguns estudos foram efetuados com cultivo em massa de microalgas (AVALA et al., 1997; LACAZ-RUIZ et al., 1993; LACAZ-RUIZ; MYAN, 1996; LACAN-RUIZ et al., 1999).

Outros estudos mais recentes incluem aspectos relacionados com a distribuição do nitrogênio intracelular (LOURENÇO et al., 2004); crescimento e composição química em cultivos estanques de microalgas marinhas (BORGENS-CAMPOS et al., 2010; COSTARD et al., 2012); biocombustíveis, incluindo aspectos da disponibilidade de CO<sub>2</sub> durante o crescimento, assimilação de nutrientes e composição química de espécies marinhas potencialmente importantes para a produção de biodiesel (CARDOSO et al., 2011; FARIA et al., 2012; FRANCO, 2013; FRANCO et al. 2013); caracterização química e capacidade de complexação de metais de exsudatos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) (TONIETTO et al., 2014); cultivo heterotrófico de microalgas a partir de Glicose (BASTOS et al., 2011; BONINI; BASTOS, 2012); potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel (MENEZES et al., 2013).

### 3.3 Importância da biotecnologia das microalgas

Os cultivos de microalgas constituem processos tecnológicos que utilizam o rápido crescimento das algas para produzir biomassa. Como se tratam de microorganismos fotoautotróficos, obtém-se bom crescimento das células desde que existam condições nutricionais e fóticas adequadas ao seu desenvolvimento. O elevado crescimento das células é consequência da elevada relação superfície:volume que esses organismos apresentam, além da sua capacidade de se reproduzirem assexuadamente. Este processo reprodutivo pode duplicar o tamanho da população a cada 8 horas, dependendo da espécie (RICHMOND, 1999), garantindo que grandes volumes de biomassa possam ser obtidos rapidamente, usando espaços pequenos.

Desde que várias espécies podem conter mais de 50 % de proteína (BECKER, 1995) o aproveitamento mais promissor das microalgas tem sido a produção de alimento. Mas as microalgas também têm importância ambiental muito grande, porque podem ser utilizadas no controle da qualidade da água, particularmente na remoção de compostos tóxicos, incluindo amônia ( $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2$ ), em efluentes de carcinicultura (CHUNTAPA; POWTONGSOOK, 2003; VÍLCHEZ et al., 1997) e na remoção de compostos nutricionais em estações de tratamento de água (VÍLCHEZ; VEGA, 1994).

Outra importância ambiental particular das microalgas são as florações naturais que ocorrem em circunstâncias excepcionais. Muitas dessas florações podem ser de espécies tóxicas, e nesses casos os impactos ambientais decorrentes trazem tanto consequências sociais como econômicas negativas muito significativas, inclusive com danos à saúde pública. No Brasil, muitos episódios de florações nocivas recentes têm sido registrados ([http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/V\\_FANSA.pdf](http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/V_FANSA.pdf)), mas o caso mais dramático ocorreu em 1996 em Caruaru-Pernambuco, onde mais de 60 pessoas que faziam hemodiálise, morreram intoxicadas com uma microcistina produzida pela cianobactéria do gênero *Microcystis* (<http://www.tratamentodeesgoto.com.br>).

Desta forma os cultivos de microalgas visando o potencial biotecnológico vem crescendo nos últimos anos. As primeiras fazendas de cultivo em massa de microalgas em escala comercial foram implantadas no início dos anos 60 no Japão, utilizando *Chlorella*. Nos anos 70 foi introduzido o cultivo em massa de *Spirulina*. Nas Américas, o primeiro país a empregar essa técnica foi o México, no Lago Texcoco, pela empresa Sosa Texcoco S.A, em 1977, e no mesmo período a empresa Dai Nippon Ink e Chemicals Inc. estabeleceram o cultivo comercial de *Spirulina* na Tailândia. Por volta de 1980 um total de 46 fábricas de

produção em larga escala já operavam na Ásia (KAWAGUCHI, 1980) e em 1996 cerca de 2000t de *Chlorella* foram produzidas somente pelo Japão. Outras fazendas de produção em massa de *Spirulina* também foram estabelecidas nos USA, como a Microbio, na Califórnia e a Cyanotech, no Hawaii. Cuba produz atualmente cerca de 100 toneladas anuais de biomassa de *Spirulina* como matéria-prima para centenas de produtos, desde loções contra queda de cabelo e cremes emagrecedores, até vitaminas que reduzem os estragos causados pelo câncer e pela aids (<http://www.tierramerica.net/2002/1215/particulo.shtml>).

Apesar da enorme possibilidade de que uma grande diversidade de microalgas possa ser utilizada para as mais diversas finalidades tecnológicas, a produção comercial atual de microalgas em larga escala tem se restringido a algumas poucas espécies. Em particular destacam-se *Haematococcus pluvialis* empregada para produzir o pigmento astaxantina; *Dunaliella salina*, que fornecem o pigmento  $\beta$ caroteno, precursor da vitamina A, e *Chlorella* sp e *Arthrospira platensis* (= *Spirulina platensis*), que produzem proteína, empregadas, particularmente, na alimentação humana e em ração animal (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988).

As espécies *Tetraselmis shuui*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis* spp., *Skeletonema costatum* têm sido usadas em projetos de aquíicultura (BENNEMANN, 1989) e diversas cianobactérias são utilizadas como fertilizante orgânico em fazendas agrícolas, particularmente para a produção de arroz (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988). Atualmente, três gêneros têm atraído os maiores interesses comerciais: *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella*; mas outras espécies como *Isochrysis* sp. *Pavlova lutheri* e *Nannochloropsis oculata* também tem sido testadas, particularmente para produção de aminoácidos em escala experimental (BROWN et al., 1993).

Os cultivos podem ser desenvolvidos tanto através de sistemas estanques, usualmente denominados de cultivos de batelada (*batch cultures*), ou mediante o uso de sacos de diálise, ou, ainda, usando sistemas de culturas contínuas. Desde que existam condições adequadas para o crescimento das células obtém-se altas quantidades de biomassa, qualquer que seja o sistema de cultivo empregado (ANDERSEN, 2005).

No primeiro caso, o ambiente de cultivo é altamente variável, uma vez que não há renovação do meio de cultivo e ao mesmo tempo em que nutrientes são usados há acúmulo de produtos de metabolismo algal que é excretado ao meio, fazendo com que o sistema se torne menos eficiente. Por serem abertos há contaminações frequentes de outros organismos que acabam por interferir tanto na qualidade final da biomassa produzida como na eficiência do

cultivo. Entretanto, por ser de baixo custo constitui um dos sistemas mais utilizados mundialmente.

No segundo caso, empregam-se membranas de diálise que separam a cultura de uma solução estoque de nutrientes. A membrana permite o livre fluxo de materiais orgânicos e inorgânicos dissolvidos liberados pelo metabolismo celular e ao mesmo tempo a entrada de novo meio ao redor das células. O ambiente de cultivo permanece desse modo estável, mas as limitações do método quanto à dimensão do sistema de cultivo impedem a sua aplicabilidade em cultivos em larga escala. Usualmente esses sistemas são mais utilizados para estudos refinados do ponto de vista bioquímico e fisiológico de espécies em cultivo, em condições laboratoriais.

O terceiro caso constitui sistemas contínuos de cultivos usualmente denominados de fotobiorreatores, que oferecem às células em cultivo condições nutricionais constantes, garantidas pela entrada de novo meio de cultura por um lado e remoção regular da biomassa produzida juntamente com o excedente do meio nutritivo usado pelo outro. Dessa maneira o ambiente de cultivo é estabilizado quimicamente, permitindo a manutenção de uma elevada taxa de crescimento celular. Diversas vantagens podem ser relacionadas com o uso desse sistema: a) Manutenção dos cultivos livre de contaminantes; b) Renovação constante do meio de cultivo; c) Concepções simples e variadas dos ambientes de cultivo, os quais podem ser de formato tubular ou plano, dependendo do material utilizado; d) podem ser construídos inclusive com materiais reciclados como garrafas pet, por exemplo, placas de vidro, plástico transparente ou acrílico.

Nos sistemas de fotobiorreatores o custo necessário para recuperar a biomassa produzida pode ser bastante significativo quer se utilize centrifugação, filtração, secagem em leito, ou outro método (MOLINA GRIMMA et al., 2003). Sem dúvida, este fato pode elevar bastante o custo final da produção, mas mesmo assim esse custo é menor quando comparado com os cultivos estanques, porque neste caso os cultivos são mais diluídos (BOROWITZKA 1999), e a produção, menor.

Quer empregando sistemas estanques ou fotobiorreatores os cultivos intensivos de microalgas representam hoje um dos mais modernos processos da biotecnologia. A partir desses cultivos é possível obter-se energia, alimento e vários outros produtos de interesse nutricional, farmacológico e industrial a custos muito inferiores do que aqueles empregados pela agricultura tradicional e numa velocidade de produção muito mais rápida (<http://www.spirulinasource.com/earthfoodintro.html>).

O potencial de aplicação tecnológico desses pequenos organismos e de produtos derivados do seu metabolismo é imenso. O recente interesse pela produção de biomoléculas derivadas de microalgas que possam fornecer energia tem alavancado pesquisas no mundo todo visando à utilização de moléculas lipídicas produzidas pelas microalgas, para a produção de biocombustíveis, particularmente o biodiesel (BANERJEE et al., 2002; CHISTI, 2007; GAVRILESCU; CHISTI, 2005; HANKAMER et al., 2007; ROESSLER et al., 1994; SAWAYAMA et al., 1995) e o metano produzido a partir da digestão anaeróbica da biomassa da alga (SPOLAORE et al., 2006). Assim, consorciado com produção de biodiesel microalgal pode-se obter ainda uma substancial quantidade de metano pela digestão da biomassa algal residual, o que torna o processo produtivo particularmente interessante como sistema de produção limpa e eficiente que não cria passivos ambientais, e ainda contribui de forma efetiva com a redução do aquecimento global. A biomassa algal residual pode ser utilizada como suplemento alimentar da dieta humana e no preparo de ração animal, fertilização do solo (SKJANES et al., 2007) e em projetos de aquicultura (BROWN et al., 1997).

Qualquer que seja o sistema de cultivo adotado é necessário monitorarem-se as condições de cultivo, não somente em termos das variáveis ambientais como temperatura e iluminação, mas também das variáveis físicas e químicas do meio de cultivo, como pH, concentrações de gás-carbônico e nutrientes, entre outras, visto que a melhor eficiência dos cultivos acontece em condições ideais que via de regra variam de espécie para espécie. Algumas variáveis dentre as relacionadas podem limitar o desenvolvimento dos cultivos (RICHMOND, 1999), havendo assim a necessidade de ajustá-las para oferecer as melhores condições de cultivo, visando a sua otimização.

Além disso, para a obtenção de biodiesel a partir de microalgas é preciso que a espécie em cultivo seja de fato uma produtora potencial de óleo. Não basta apenas identificar quais espécies armazenam mais ou menos óleo, é necessário testar em que condições elas produzem mais óleo, visto que fatores ambientais como temperatura, luz e nutrientes podem mudar o metabolismo lipídico das algas (GUSHINA; HARWOOD, 2006), e a habilidade que muitas espécies têm para se adaptarem às condições ambientais reflete-se na ampla variedade de padrões lipídicos que podem apresentar (THOMPSON, 1996). Assim, para o sucesso dos cultivos em massa visando à produção de óleo, todos esses aspectos precisam ser pesquisados cuidadosamente.

Desde que muitos produtos das microalgas são metabólitos secundários produzidos quando seu crescimento é limitado, muitas pesquisas estão em andamento visando otimizar os cultivos. Quando saudáveis as células usualmente produzem baixas concentrações de

substâncias de reserva ricas em lipídios, e quando em cultivos submetidos a estresses momentâneos (em intervalos de tempo de até 48 horas) promovidos por mudanças nas concentrações de nutrientes específicos como o nitrogênio e o fósforo ou nas condições fóticas as células sofrem alterações no estado fisiológico, fazendo com que as células armazenem mais substâncias ricas em energia em seus tecidos. Tem-se observado que algumas espécies têm sua produtividade reduzida por fotoinibição (VONSHAK et al., 1988) e que a uréia pode influenciar o crescimento e o teor do ácido graxo linolênico (SASSANO, 1999). Conhecimentos desse tipo são vitais para o sucesso de cultivos quando se tem em mente a extração de produtos comercialmente importantes como no caso dos biocombustíveis.

Apesar das microalgas serem uma fonte única de compostos de alto valor econômico, a aplicação comercial desses produtos ainda é pequena (BOROWITZKA, 1999). No entanto, considerando-se o interesse pela implantação de fazendas de cultivos controlados visando obtenção de novos produtos, a inovação técnica continuada para atender as demandas de mercado pode resultar em vantagens futuras, antevê-se que a busca por novos produtos e outras espécies comercialmente importantes deverá aumentar de forma significativa, inclusive com o melhoramento genético de linhagens.

Além dos produtos referidos acima outros compostos de importância comercial são extraídos das microalgas, tais como os carotenoides como o  $\beta$ -caroteno, astaxantina e cantaxantina, utilizados em diversas aplicações comerciais quer seja como corantes naturais de alimentos, antioxidantes e como alimentação aditiva em cultivos de peixes salmonídeos (BOROWITZKA, 1988; BEN-AMOTZ, 1999; LIAAEN-JENSEN; EGELAND, 1999). As ficobilinas, que são pigmentos produzidos por cianobactérias, rodofíceas e criptofíceas (ex.: ficocianina e ficoeretrina) têm aplicações como corantes de alimentos, em cosméticos e como óleo fluorescente para citometria de fluxo em ensaios imunológicas e outras aplicações, sendo que na atualidade a principal fonte comercial é a microalga *Spirulina* e as algas vermelhas unicelulares *Porphyridium* e *Rhodella*; as neurotoxinas, que constituem um grupo variado de metabólitos bioativos que tem significativo potencial farmacêutico com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação e produzem distintos efeitos biológicos (Pal, 2000).

As inúmeras vantagens para usar microalgas na produção de proteína, quando comparadas com fontes habituais de proteína (como a carne ou a soja) são conhecidas. Muitas microalgas possuem alto teor de proteínas e elevada velocidade de crescimento, o que leva a uma rápida produção de biomassa, sendo que esta pode ser contínua e independe das condições do ambiente e por ser de natureza unicelular fica assegurada uma biomassa com a mesma composição bioquímica, diferente de plantas terrestres que apresentam compostos

localizados em partes específicas (fruta, folha, semente ou raiz) (BEKATOROU et al., 2006; DERNER et al., 2006; LOURENÇO, 1996). A tabela 2 demonstra as vantagens de se obter proteínas a partir de microalgas.

**Tabela 2** - Comparação entre proteína de carne bovina e proteína a partir de microalgas.

	<b>Proteína de carne bovina</b>	<b>Proteína de Microalga</b>
Espaços	Grandes	Pequenos
Tempo para produção de proteína	28 meses	15 dias (tempo de geração 2-6 h)
Proteína/dia/1.000 lb (1lb = 434 gr)	1 lb	10 <sup>13</sup>
Medicamentos de controle	Grande	Nenhum
Manejo de sistema produtivo	Grande	Pequeno

Fonte: Carvalho, 1986; Lourenço, 1996.

*Spirulina* é uma das algas mais antigas da Terra, com cerca de 3,0 bilhões de anos (YANG et al., 1997). Tem sido muito usada na alimentação humana e também é conhecida por ter vários compostos bioativos. Em particular, *S. platensis* tem sido usada para melhorar a imunidade das pessoas e também tem sido muito usada na medicina tradicional chinesa. Estudos pré-clínicos e estudos clínicos sugerem que a *Spirulina* tem um efeito terapêutico certo (FOX, 1996), atuando na redução do colesterol do sangue, proteção contra alguns tipos de câncer, equilíbrio do sistema imunológico, aumento dos lactobacilos intestinais, redução de nefrotoxicidade por metais pesados e drogas, proteção à radiação ultravioleta, redução de hiper-lipidemia e obesidade (BELAY et al., 1993). Ayehunie et al., (1998) reportam, ainda, que um extrato aquoso de *S. platensis* inibia parcialmente a replicação do vírus em células T, em células mononucleares periféricas e em células de Langerhans, em humanos infectados com HIV1. Pesquisas têm demonstrado também que *S. platensis* pode inibir reações anafiláticas em ratos (YANG et al., 1997).

A *Spirulina* é produzida comercialmente em varias partes do mundo e o produto seco é um valioso suplemento alimentar (BELAY, 2002), com baixas concentrações de ácidos nucléicos e aminoácidos, similares às recomendações da FAO (CIFERRI; TIBONI, 1985; RICHMOND, 1988). É rica em proteínas (60–70% em peso), vitaminas (especialmente B12 e β-caroteno), e sais minerais. Contém muitos aminoácidos essenciais e ácidos graxos, sendo, ainda, uma das fontes de ácido linolênico (GLA). Também existe a possibilidade de obter-se outros produtos como pigmentos como carotenóides, ficocianinas e clorofilas, vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados, incluindo os ácidos graxos omêga-3 (SPOLAORE et al., 2006)

Microfazendas de *Spirulina* estão crescendo ao redor do mundo. E as pessoas estão aprendendo a produzir *Spirulina* em pequena escala para sua auto-suficiência ou para obter algum ganho extra. Em países desenvolvidos, vilas de *Spirulina* estão crescendo visando melhoras na saúde de crianças subnutridas, e como uma nova fonte que resultará na melhoria da na economia local (<http://www.spirulinasource.com/microfarms.html>).

*Dunaliella salina* é outra espécie que tem sido cultivada intensivamente para produção de  $\beta$ -caroteno por empresas como a Aqua Carotene Ltd na Austrália (<http://www.aquacarotene.com/corporate.html>), Hutt Lagoon, Oeste da Austrália (<http://www.atns.net.au/biogs/A000955b.htm>) e em Whyalla, no Sul da Austrália (<http://www.austasiaaquaculture.com.au/book.php?newsID=4490>, RAJA et al., 2007), A biomassa produzida é extraída e o  $\beta$ -caroteno puro ou carotenóides são vendidos como suplemento nutricional e corante natural de alimentos. *Dunaliella* seca também é vendida como aditivo alimentar e para aquíicultura para pigmentação de crustáceos.

Outras fábricas comerciais similares também foram implantadas em Israel, nos USA e na Índia. Mais recentemente, várias empresas foram estabelecidas nos USA e na Índia, visando cultivar *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina. Constata-se, assim, que a indústria da biotecnologia de microalgas cresceu e se diversificou significativamente em pouco mais de 30 anos.

Os valores nutricionais de *Chlorella*, outra microalga importante, do ponto de vista da biotecnologia, são excepcionais. Em sua composição química contém cerca de 10% em sais minerais, 44% de albumina, 12% de lipídeos cerca de 45% de proteínas, além de betacaroteno, vitamina B1, B2, B6, B12, E, C e K1 ([http://www.gtamart.com/mart/products/chlorella\\_vulgaris](http://www.gtamart.com/mart/products/chlorella_vulgaris)).

A astaxantina além de ser usada como um pigmentador de salmões cultivados em fazendas de piscicultura, é também uma substância antioxidante e tem sido descrita como tendo importância na remoção de radicais livres, imunomodulação e prevenção do câncer (MARGALITH, 1999).

As ficocianinas, um pigmento azul é usado como corante alimentar no Japão (O'CALLAGHAN, 1996). A tendência mundial é substituir os corantes artificiais por corantes naturais. Isso sugere a possibilidade de exploração de clorofila para esse propósito, uma vez que a *Spirulina* tem uma das mais elevadas fontes de clorofila-a na natureza (PELIZER et al., 2003).

Muitas microalgas também produzem metabólitos bioativos que tem significativo potencial farmacêutico, como por exemplo, o ácido ocadaico, uma poderosa toxina que pode

matar peixes e moluscos e que é também um promotor de tumores, sendo encontrado em muitos dinoflagelados do gênero *Dinophysis* e *Prorocentrum* (COHEN et al., 1990). Saxitoxinas e seus análogos também têm sido investigados. Esses compostos são importantes ferramentas para se estudar os efeitos de vários agentes sobre sistemas neuromusculares.

Os ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados (PUFAs) são valiosos produtos farmacêuticos e ingredientes de alimentos que tem efeitos benéficos na saúde humana (variedade de cânceres e doenças inflamatórias). No presente, PUFAs são comercialmente produzidos de óleo de peixes que é uma fonte insuficiente desses compostos (COHEN, 1994). Algumas microalgas, como a *Crypthecodinium cohnii* é conhecida por sua habilidade em acumular ácidos graxos que tem uma alta fração (30–50%) de DHA (Ácido docohexaenóico). Muitas microalgas também armazenam quantidades de lipídeos em proporções muito superiores às encontradas na soja e na palma, e estão sendo hoje investigadas visando cultivos em massa para a produção de biodiesel (CHISTI, 2007).

Apesar das microalgas serem uma fonte única de compostos de alto valor econômico, a aplicação comercial desses produtos ainda é pequena (BOROWITZKA, 1999). No entanto, considerando-se o interesse pela implantação de fazendas de cultivos controlados visando obtenção de novos produtos, a inovação técnica continuada para atender as demandas de mercado pode resultar em vantagens futuras. Antevê-se que a busca por novos produtos e outras espécies comercialmente importantes deverá aumentar de forma significativa, inclusive com o melhoramento genético de linhagens. Neste contexto, a engenharia genética deverá ocupar papel de destaque, e certamente ela será útil tanto para pessoas como para o planeta (AVERY, 2004).

Por necessitarem de pequenos espaços e baixas taxas de subsídios energéticos e químicos o cultivo de microalgas poderá se tornar a forma mais adequada de produção de alimento no futuro de forma a garantir sustentabilidade ambiental. Fazendas de microalgas poderão se espalhar pelo planeta, gerando em pequenos espaços muito mais alimento e energia do que se retira hoje com a agricultura extensiva. Muitas microalgas armazenam substanciais quantidades de lipídeos muito acima de plantas oleaginosas comuns como a soja e a palma, e as pesquisas sobre a utilização de microalgas na produção de biocombustíveis são hoje o que há de mais avançado em termos de biotecnologia das microalgas, apesar de que o futuro dessa novíssima fonte de biocombustível é tão promissor quanto imprevisível. Não resta dúvidas, portanto, que a biotecnologia dos cultivos de microalgas poderá criar novos recursos contribuindo com a melhoria da qualidade ambiental e conservação da biodiversidade e, por conseguinte, da qualidade de vida da população humana.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação dos meios de cultura

#### 4.1.1 Meios sintéticos ou definidos

Para os cultivos e manutenção das microalgas utilizadas na pesquisa foram utilizados os meios sintéticos Zarrouk (ZARROUK, 1966) e WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) preparados com água destilada autoclavada e deixada em repouso por 24 horas em temperatura constante para a re-oxigenação. Após este tempo, foram adicionados à água todos os macronutrientes, micronutrientes e vitaminas presentes nos referidos meios de cultura (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3-** Composição do Meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

<b>Soluções de Trabalho</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades (g) dissolvida em água destilada</b>
1- KNO <sub>3</sub>	15,0 em 200 mL
2- NaCl	33,0 em 200 mL
3- MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 em 200 mL
4- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 em 200 mL
5- CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,58 em 200 mL
6- Na <sub>2</sub> EDTA	6,4 em 100 mL
7- FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 em 100 mL
8- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,142 em 100 mL
9- Solução mista	*
*Solução mista. Dissolver os cinco sais abaixo (g) em 100 ml de água destilada.	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049g (pode ser substituído por CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O ou CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,144g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,882g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0157g
MoO <sub>3</sub>	0,071g (pode ser substituído por NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)
<b>Preparação de 1,0 litro de meio de cultura (água destilada)</b>	
A - Dissolver em 600 ml de água destilada 15,0 g de NaHCO <sub>3</sub> .	
B - Na solução anterior, dissolver 2,0 g de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	
C - Acrescentar 10,0 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 5.	
D - Acrescentar 1,0 mL das soluções 6, 7, 8 e 9.	
E - Completar o volume a 1.000 mL e autoclavar.	

**Tabela 4** – Composição do Meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972).

<b>Solução estoque</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	36.8 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	37 g
NaHCO <sub>3</sub>	12.6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	11.4 g
NaNO <sub>3</sub>	85 g
Água destilada	1000 mL
<b>Solução de silicato</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	21.2 g
Água destilada	1000 mL
<b>Solução de micronutrientes</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	4.36 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.022 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.18 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.006 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 g
Água destilada	1000 mL
<b>Solução de vitaminas</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Tiamina HCl	0.1 g
Biotina	0.0005 g
Água destilada	1 L
<b>Composição do meio</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
Solução estoque	1mL
Solução de silicato	1mL
Solução de micronutrientes	1mL
Solução de vitaminas	1mL
Tri(hidroximetil)-amino metano	0,115g
Água do meio	1000 mL

#### 4.1.2 Meios de cultura alternativos ou indefinidos

##### 4.1.2.1 Extrato do solo de canavial regado com vinhaça

O material necessário para a preparação deste meio de cultura (solo de canavial e vinhaça) foi obtido junto à Usina Japungú, situada no município de Santa Rita-PB, e levado para LARBIM/UFPB. O solo foi separado em duas bandejas, regado com vinhaça bruta para simular a aspersão de vinhaça nos canaviais do jeito que os produtores locais fazem durante o

período da safra, sendo uma bandeja exposta ao sol e a outra mantida na sombra por 30 dias para mineralização dos nutrientes. Ambas foram regadas periodicamente com água deionizada. Passados os 30 dias 1kg de solo de cada bandeja foi adicionado a 2L de água deionizada, deixado em repouso para decantação e em seguida filtrado em papel-filtro em bomba de vácuo. O filtrado foi utilizado para inóculo das cepas de microalgas, sendo usado nas proporções de 100% (extrato bruto) e 50% (50% de extrato de solo + 50% de água deionizada) após autoclavagem.

#### 4.1.2.2 Extrato de Biocomposto

O biocomposto utilizado nos experimentos foi obtido junto a EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas), o qual foi preparado a partir da compostagem de restos de legumes e verduras comercializados na empresa. A preparação do meio de cultura usando o biocomposto baseou-se na formulação do Meio Erd-Schreiber (GROSS, 1937) apresentada na tabela 5, porém sem a adição da solução-estoque de silicato de sódio e adicionando-se no lugar de extrato de solo 5ml da solução de extrato de biocomposto. Para a preparação deste extrato foram misturados 1kg de biocomposto com 1L de água destilada sendo a mistura fervida por 30 minutos (em autoclave), deixado em repouso por três dias, recolhendo-se em seguida a fração líquida a qual foi filtrada em papel-filtro. O filtrado foi autoclavado por 30 minutos, deixado esfriar e conservado em refrigerador (4°C), mantendo-o em condição estéril, sendo o frasco aberto para a constituição do meio de cultura apenas junto a um bico de Bunsen ou no interior de uma capela.

**Tabela 5-** Composição do Meio Erd-Schreiber (GROSS, 1937), (modificado com biocomposto).

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>
1. Água destilada	955 mL
2. Nitrato (Solução estoque)	1,0 mL
3. Fosfato (solução estoque)	1,0 mL
4. Extrato de biocomposto	5 mL
<b>Preparação das soluções-estoque</b>	
1. Solução-estoque de nitrato de sódio Dissolver 40,0g de NaNO <sub>3</sub> em 200ml de água destilada	
2. Solução-estoque de fosfato de sódio Dissolver 4,0g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> em 200 ml de água destilada	

#### **4.1.2.3 Extrato de esterco de galinha**

O esterco de galinha foi obtido junto a uma granja avícola no município do Conde-PB. No LARBIM/UFPB 1kg do esterco foi misturado em 1L de água destilada e deixado em repouso por 24 horas. Após este tempo foi retirada a fração líquida, filtrada em tela de nylon e papel-filtro e posteriormente autoclavada por 30 minutos. Depois resfriada e conservada em refrigerador. O frasco foi mantido estéril e aberto apenas em bico de Bunsen ou no interior de uma capela apenas nos momentos de preparação do meio de cultura. Para cada litro de água destilada autoclavada foi adicionado 1ml da solução de extrato de esterco de galinha, sendo o pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH.

#### **4.2 Obtenção das culturas: coletas, isolamento, purificação e manutenção dos cultivos**

Na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) o Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM) possui um banco de microalgas mantido a mais de 20 anos, com aproximadamente 320 cepas e com várias espécies marinhas e de água doce. Vários trabalhos utilizando cultivo de microalgas já foram produzidos, focando especialmente aspectos ecológicos e ecofisiológicos (MELO et al., 1993; SASSI, 1987; SASSI; MOURA, 1988; SASSI et al., 1988; VIDAL; SASSI, 1998), desta maneira as condições infraestruturais oferecidas por este laboratório tornaram possível a realização desta pesquisa.

Durante o ano de 2012 foram realizadas coletas de microalgas na região semiárida dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte (localidades de Frei Martinho, Cuité, PB e Currais Novos, RN) em açudes, barreiros, olhos d'água, rios temporários e em tanques de dessedentação de animais domésticos, bem como na represa de Acauã, localizada no município de Itatuba, na microrregião do Cariri Ocidental, PB.

O material foi coletado manualmente em frascos de vidro ou garrafas PET e transportado ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) em condições herméticas. Alíquotas das amostras totais foram transferidas para balões de vidro autoclavados contendo os meios de cultura WC e Zarrouk, os quais foram mantidos numa câmara de cultivo a 25° C ( $\pm 1^\circ$  C) dotadas de sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, com fotoperíodo natural controlado por uma fotocélula externa.

Constatando-se crescimento de células procedeu-se o isolamento das mesmas em microscópio binocular usando micropipetas capilares, transferindo-se individualmente cada

uma das espécies que cresceram nos balões contendo as amostras coletadas nas diferentes localidades para tubos de ensaio autoclavados contendo meio de cultura, sendo os mesmos mantidos na câmara de cultivo. As culturas unialgais obtidas foram codificadas e incorporadas ao Banco de Microalgas do LARBIM/UFPB, sendo mantidas em tubos de ensaio de 5mL com meio de cultura com repicagens mensais. Clones de cada cepa foram também mantidos numa câmara de germinação com sistema de iluminação e fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de  $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ .

### **4.3 Experimentos laboratoriais de crescimento e produção de biomassa nos meios sintéticos para análise de ácidos graxos**

As espécies isoladas dos diferentes ambientes de coleta da região semiárida da Paraíba e Rio Grande do Norte foram cultivadas nos respectivos meios de cultura que vinham sendo mantidas no banco de cultura do LARBIM/UFPB, visando a análises do perfil de ácidos graxos. Para este propósito os cultivos foram efetuados na câmara de cultivo do LARBIM (fotoperíodo de 12 horas, temperatura  $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ) em balões de 6 litros contendo 5 litros de meio de cultura (WC ou Zarrouk, conforme a espécie), com aeração fornecida por um minicompressor de membrana Resun AOC2. No total foram cultivadas 14 cepas de microalgas, incluindo-se 2 cepas com 4 clones de cada, para este propósito.

### **4.4 Cultivos em meios alternativos**

As cepas mais produtoras de ácidos graxos de interesse para a produção de energia (biodiesel) e/ou na indústria de alimentos foram escolhidas para a realização dos cultivos em meios alternativos, os quais foram desenvolvidos na câmara de cultivo do LARBIM e comparando-se sempre o seu desempenho com cultivos efetuados nos meios sintéticos WC ou Zarrouk, conforme a espécie (controles). Nesta etapa foram selecionadas duas cepas locais, D39Z (*Oscillatoria tenuis* (?)) e D115WC (*Scenedesmus acuminatus*), além de uma cepa exótica, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Sérgio Lourenço da UFF (D9Z, *Spirulina platensis*) introduzida nesses ensaios com o propósito de comparar seu desempenho nesses meios alternativos, e também porque é uma espécie com elevado teor de proteína (mais que 60%), mundialmente cultivada para fins nutracêuticos, e por ser de nosso interesse avaliar a sua aceitabilidade em agricultores do semiárido paraibano, conforme apresentado nos objetivos específicos e e f. Os seguintes experimentos foram realizados:

- a) cultivos em extrato de solo de canavial regado com vinhaça. Realizados com as cepas D39Z, D115WC e D9Z em balões de 1 litro contendo 800ml de meio, mantendo-se um cultivo controle para cada espécie nos meios sintéticos Zarrouk (D39Z e D9Z) e WC (D115WC).
- b) Cultivos em extrato de biocomposto e esterco de galinha: Efetuados com as cepas D39Z, D115WC e D9Z, em balões de 6 litros contendo 5 litros de meio, mantendo-se um cultivo controle para cada espécie nos meios sintéticos Zarrouk (D39Z e D9Z) e WC (D11WC).

Todos os cultivos foram realizados na câmara de cultura climatizada do LARBIM/UFPB (fotoperíodo de 12 horas; temperatura  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sob aeração, mediante a injeção contínua de ar por um minicompressor de membrana Resun AOC3. O início dos cultivos partiu de um inóculo de 2 ml de cada cepa em balões de 250ml com meio WC ou Zarrouk, otimizando-os em cerca de 5 dias. Em seguida, inóculos de cada cepa foram transferidos para os balões experimentais na concentração inicial de cerca  $10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$ , realizando-se contagens em câmaras de Fuchs Rozenhal e em câmaras de Sedgewick-Rafter (para as espécies filamentosas).

#### **4.5 Produção de biomassa de *Spirulina platensis* (D9Z) para teste de aceitabilidade alimentar com agricultores do semiárido paraibano**

Esses cultivos foram efetuados na câmara de cultivo do LARBIM/UFPB em frascos mariotes de 20 litros estéreis e em meio Zarrouk, visto que o propósito era produzir biomassa apenas para uso em alimento. Também foi implantado a título de demonstração aos agricultores da região semiárida, um cultivo em tanque, o qual foi instalado no sítio Quinturaré, município de Frei Martinho, PB.

#### **4.6 Acompanhamento dos cultivos**

Todos os cultivos desenvolvidos, seja para a produção de biomassa para a determinação dos ésteres de ácidos graxos ou para avaliar o desempenho do crescimento das espécies em meios alternativos, foram acompanhados por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenhal e em câmaras de Sedgewick-Rafter (para as espécies

filamentosas), em microscópio binocular Leica DM 1000, ou através de medidas da fluorescência *in vivo* usando um Fluorômetro Turner Design 10005R, em triplicatas. Durante as contagens em microscópio também foram efetuadas observações do estado fisiológico das células e avaliados aspectos da sua morfologia.

As curvas de crescimento de cada espécie cultivada foram traçadas utilizando os parâmetros de crescimento acima referidos, a partir das quais foi possível determinar o tempo de cultivo, a duração da fase exponencial, a velocidade de crescimento ( $k$ ), e o rendimento final em biomassa. Todas as curvas obtidas foram ajustadas com o programa estatístico Curve Expert versão 1.3 pela aproximação à curva logística, conforme Pindich e Rubinfeld (1981) e segundo Derner (2006).

A velocidade de crescimento ( $k$ ), a qual representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada através da equação 1, citada em Stein (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \text{Log} \frac{N_2}{N_1} \quad (1)$$

Onde:

$k$  = velocidade de crescimento.

3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10.

( $T_2 - T_1$ ) = intervalo de tempo em dias.

$N_1$  = densidade celular inicial.

$N_2$  = densidade celular final.

Log = logaritmo em base 10.

No final da fase exponencial de crescimento os experimentos foram interrompidos e o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 18 °C, sendo os concentrados congelados (-40 °C), e posteriormente liofilizados num liofilizador Terroni. A biomassa seca das cepas do semiárido foi pesada e guardada em recipiente hermético em geladeira para posteriores análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos. A biomassa seca da cepa D9Z (*S. platensis*) cultivada em frasco mariote de 20 litros também foi guardada nas mesmas condições para análise microbiológica e para os testes de aceitabilidade. Biomassa úmida desta espécie, obtida nos cultivos em frascos de 20 litros, foram mantidas em freezer até o momento de serem levadas para os testes de aceitabilidade nas comunidades rurais, onde foram mantidas em refrigerador e posteriormente em caixas de isopor durante o seu transporte na zona rural, nos diferentes sítios onde a pesquisa de aceitabilidade foi desenvolvida.

#### 4.7 Análise do perfil e teor ésteres de ácidos graxos

As análises da composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos e os cálculos do teor de ésteres das espécies isoladas da região semiárida da Paraíba e Rio Grande do Norte foram efetuados no Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES) da Universidade Federal de Goiás, pela equipe do Prof. Dr. Nelson Antoniosi Filho, através de cromatografia gasosa, usando um Cromatógrafo a Gas Agilent 7890, equipado com detector FID e injetor split/splitless, seguindo os procedimentos descritos em Menezes et al. (2013).

#### 4.8 Análise microbiológica

Foi realizada a análise microbiológica na biomassa da cepa D9Z (*Spirulina platensis*) utilizada para elaboração de alimentos enriquecidos e ofertados para aceitação dos produtores rurais. Os alimentos enriquecidos foram bolo produzido a partir de mistura para bolo sabor chocolate, suco de polpa de acerola e abacaxi e sorvete de chocolate, todos industrializados e comprados em comércio local.

Foram realizadas análises do Número Mais Provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes, pesquisa de *Salmonella*, contagem de *Bacillus cereus* e contagem de *Stafilococcus* coagulase positiva de acordo com as normas preconizadas pela agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com base na resolução RDC nº 12, de 2 de fevereiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos que estão descritos na tabela 6, utilizando a metodologia recomendada por Brasil (2003). As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Química de Alimentos (DTQA/CT/UFPB).

**Tabela 6** – Padrões de avaliações microbiológicas para alimentos, conforme resolução RDC nº 12, de 2 de fevereiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Microrganismos pesquisados	Padrões microbiológicos
Coliformes a 45°C/g (NMP/g)	10
<i>Salmonella</i> sp/25g (UFC/g)	Ausência
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g (UFC/g)	5x10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus cereus</i> /g (UFC/g)	5x10 <sup>2</sup>

NMP/g = Número mais provável por grama; UFC/g = Unidades Formadoras de Colônias por grama referentes à RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

#### 4.9 Taxonomia

A identificação das espécies foi feita através de literatura especializada utilizando critérios diacríticos (HINDAK, 1990), realizando-se observações morfológicas dos principais caracteres usados na taxonomia de cada cepa isolada. Nesta etapa utilizou-se um microscópio Leica DM2500 equipado com câmera fotográfica digital e sistema de captura de imagens. Cada espécie foi fotografada em vários aumentos, inclusive em contraste de fase. As cianobactérias foram identificadas a partir de manuais tradicionais de ficologia (GEITLER; 1932; KOMARÉK; ANAGNOSTIDIS 1999, 2005) e as clorofíceas foram identificadas utilizando-se entre outras, as obras de: Bellinger e Sigeo (2010), Bicudo e Menezes (2006), Franceschini et al. (2010) e Sant'anna et al. (2006). Também foram usados artigos de referência publicados em revistas especializadas e pesquisas na internet. Vale salientar que o trabalho não tem o intuito de esgotar toda a literatura que reporte a ocorrência taxonômica destas espécies de microalgas em todo o país.

#### 4.10 Teste de aceitabilidade e intenção de compra

Visando medir a abertura a mudanças a novos alimentos pelos trabalhadores rurais da região semiárida da Paraíba foram realizados testes de aceitação de alimentos enriquecidos com *Spirulina*, tomando-se como critério de seleção das pessoas o fato de serem agricultores, residirem na zona rural e terem disponibilidade para a realização do teste. Participaram do estudo 75 trabalhadores rurais sindicalizados do município de Frei Martinho, situado a 300 km de João Pessoa, Capital do Estado da Paraíba, microrregião do Curimataú, Bioma Caatinga. A cada provador foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A) autorizando sua participação voluntária na pesquisa, informando sobre a natureza da pesquisa, objetivos, finalidade, riscos potenciais e/ou incômodos. A pesquisa teve sua aprovação pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (ANEXO B).

O teste consistiu em avaliar a aceitabilidade sobre a possibilidade de consumo de *Spirulina* adicionada em alimentos prontos (bolo de chocolate, sorvete de chocolate e suco de abacaxi com acerola) acrescidos de 10% de *Spirulina* em pó, deixando livre a escolha quanto ao tipo de alimento que cada agricultor gostaria de avaliar. Foram apresentados também para avaliação, porém não foi degustada a biomassa fresca e seca por liofilização. Todos os produtos foram avaliados em uma única sessão durante visita a casa dos produtores rurais

quanto aos atributos: aparência, odor, textura e avaliação global, utilizando escala hedônica de 9 pontos (de 1 = desgostei muitíssimo a 9 = gostei muitíssimo) (STONE; SIDEL, 1993) (APÊNDICE A). No teste de Intenção de compra utilizou-se uma escala hedônica de cinco pontos variando de “compraria” (5) a “não compraria” (1). Também foi analisado o índice de aceitabilidade (IA) considerando como 100% a maior nota alcançada na avaliação global dos produtos analisados e adotando como critério para a classificação satisfatória o índice de aceitação igual ou superior a 70% (TEIXEIRA et al., 1987), sendo que para este cálculo utilizou-se a equação 2:

$$IA = \frac{A \times 100}{B} \quad (2)$$

Onde:

A = Nota média obtida

B = Nota máxima dada ao produto.

O percentual de aceitação, indiferença e rejeição para cada atributo foi calculado a partir dos resultados obtidos na avaliação do teste de Aceitação utilizando os 9 pontos da escala hedônica. A aceitação foi calculada pelo somatório dos percentuais dos escores de “gostei ligeiramente” (6) à “gostei muitíssimo” (9), a indiferença é igual ao percentual obtido no escore “nem gostei/nem desgostei” (5) e a rejeição foi calculada pelo somatório dos percentuais dos escores de “desgostei ligeiramente” (4) à “desgostei muitíssimo” (1).

Os instrumentos foram aplicados utilizando-se de um procedimento padrão para garantir um mínimo de respostas enviesadas, com o mínimo possível de intervenções nos processos de aplicação dos questionários. Explicações foram efetuadas apenas quando solicitados, mas nunca de conteúdo, apenas de forma.

#### **4.11 Teste de atitude**

Para os testes de atitude a implantação de cultivo familiar visando avaliar atitude inovadora (abertura a mudanças) e conservadora (refratário a mudanças) dos agricultores do semiárido brasileiro, utilizou-se uma adaptação da escala de Thompson e Barton (1994) usada para medir atitudes *ecocêntricas* e *antropocêntricas* das pessoas em relação ao meio ambiente. Essa escala utiliza 16 itens, sendo oito para atitudes *antropocêntricas* e oito *ecocêntricas*. A adaptação consistiu em elencar 5 itens que evidenciam atitudes

conservadoras, 5 indiferentes e 5 inovadoras. Os participantes indicaram o seu grau de concordância ou discordância numa escala de cinco pontos, do tipo *Likert*, que varia de **1 = Concordo totalmente** a **5 = Discordo totalmente** (APÊNDICE B)

#### **4.12 Tratamento estatístico dos dados**

Os resultados para a aceitabilidade foram tratados no estatisticamente no programa Statistica7.0 através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis e análise de frequência. Os resultados para a atitude foram tratados estatisticamente no programa SPSS, através de técnicas de Componentes Principais, com rotação *Varimax*, para verificar a estrutura fatorial dos dois construtos: aberto a mudanças no tocante a novos tipos de alimentos e refratário a mudanças. Também foram calculados os coeficientes *Alpha de Cronbach* da escala usada para verificar o seu índice de consistência interna, verificando assim a congruência que cada item tem com os demais itens de cada instrumento (PASQUALI, 1997).

#### **4.13 Normatização**

A normatização do texto seguiu a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) do ano de 2011.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cultivo, taxonomia e potencialidades de aplicações biotecnológicas das microalgas isoladas

#### 5.1.1 Espécies isoladas

Foram isoladas 24 cepas de microalgas das diferentes amostras coletadas em diferentes tipos de ambientes aquáticos do Bioma Caatinga nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, as quais foram codificadas e incorporadas ao banco de culturas de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), e mantidas em meios sintéticos a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas (Tabela 7). Destas, 22 cepas foram identificadas ao nível de espécie e 1 ao nível de gênero, sendo que 3 são clones da espécie *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, 4 são clones de *Synechococcus nidulans*, 3 são clones de *Scenedesmus acuminatus* e 2 são clones de *Lagerheimia longiseta*.

**Tabela 7** - Relação microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte.

Código	Táxon	Procedência
D26Z	<i>Desmodesmus</i> sp cf <i>costato-granulatus</i>	Açude do Cais, Cuité – PB
D28Z	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>hypnosporum</i>	Açude do Cais, Cuité – PB
D29Z	Clorofícea não identificada	Açude do Cais, Cuité – PB
D37Z	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>hypnosporum</i>	Açude do Cais, Cuité – PB
D39Z	<i>Planktothrix isothrix</i>	Açude de Acauã, Itatuba – PB
D40Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Açude de Acauã, Itatuba – PB
D46Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Rio Quinturará, Frei Martinho-PB
D68Z	Clorofícea não identificada	Olho D'água da Bica, Cuité-PB
D73WC	Não identificada	Rio Quinturará, Frei Martinho-PB
D74Z	<i>Rhabdoderma lineare</i>	Barreiro Sacramento, Frei Martinho-PB
D76Z	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>hypnosporum</i>	Rio Quinturará, Frei Martinho-PB
D82Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Açude da Quixaba, Frei Martinho-PB
D112Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Açude da Quixaba, Frei Martinho-PB
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro de ovelhas, Frei Martinho-PB
D117WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro de ovelhas, Frei Martinho-PB
D120WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Açude Prainha, Frei Martinho – PB
D121WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Açude Prainha, Frei Martinho – PB
D123WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Açude Malhada Limpa, Currais Novos-RN
D124WC	<i>Monoraphidium contortum</i>	Açude do Quinturará, Frei Martinho – PB
D126WC	<i>Scenedesmus acutus</i>	Açude do Quinturará, Frei Martinho – PB
D133WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Açude Malhada Limpa, Currais Novos-RN
D134WC	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Açude Malhada Limpa, Currais Novos-RN
D142WC	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Açude Malhada Limpa, Currais Novos-RN
D147WC	<i>Hartiotina reticulata</i>	Açude Malhada Limpa, Currais Novos-RN

Z= Meio Zarrouk; WC= Meio WC.

## 5.1.2 Detalhamento taxonômico das espécies isoladas

### 5.1.2.1 Cianobactérias

a) *Planktothrix isothrix* (Skuja) Komárek & Komárková 2004 (Ordem Oscillatoriales; Família Microcoleaceae) Prancha I – Figura b.

**Descrição:** Esta espécie apresenta filamentos solitários, livre-flutuantes, retos ou levemente ondulados, ausência de bainha mucilaginosa e com movimento deslizante. As células são mais curtas que largas, quadráticas ou subquadráticas, com célula apical arredondada, sem caliptra. Aerótopos encontram-se distribuídos por todo conteúdo celular, que é na cor verde oliva, verde acastanhado, verde-azulado ou castanho avermelhado. A parede celular apresenta-se conspícua, algumas vezes espessa.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada em lagos no Amazonas (ALMEIDA, 2008); em alguns reservatórios do estado do Pernambuco, sendo um dos gêneros mais representativos (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2014; COSTA et al. 2006; MOURA et al. 2011 e LIRA et al. 2011); na Estação de Tratamento de Esgoto do município de Barbalha-CE (AQUINO et al., 2011) e Juazeiro do Norte-CE (AQUINO et al., 2010 ); no Açúde Bodocongó, situado no Estado da Paraíba, na região semiárida do Brasil (MONTEIRO E VASCONCELOS, 2013); no Lago Guaíba, urbano subtropical utilizado para abastecimento de água em Porto Alegre-RS (RIBEIRO et al., 2012); e no reservatório Argemiro de Figueiredo (Acauã, município de Itatuba, Paraíba) (CARLOS, 2013).

b) *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek in Bourrelly 1970 (Ordem Synechococcales; Família Synechococcaceae). Prancha I- Figuras c, d, e, f.

**Descrição:** Segundo Santos e Sant'Anna (2010), esta espécie apresenta células alongadas, retas, medindo de 2 a 3,4µm de comprimento por 1,2 a 2,4µm de largura; usualmente isoladas ou aos pares e raramente com 4 células juntas. Envelope mucilaginoso ausente e conteúdo celular verde azulado, homogêneo e sem aerótopos.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); em mananciais de abastecimento de água para o consumo humano no

município de Viçosa, MG (MAGALHÃES, 2007); na Lagoa Juparanã e Rio Pequeno, Linhares-ES (CAVATI; FERNANDES, 2008); no Pantanal brasileiro (SANTOS; SANT'ANNA, 2010); em um braço do reservatório do Salto Caxias na região Sudoeste do Estado do Paraná (BARTOZEK, 2012); no Canal do Piraquê, Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ (MENEZES et al., 2012); em lagoas de estabilização da Estação de Tratamento de Esgoto de Cascavel, Paraná (RIEDGER, 2013). Esta espécie foi isolada do açude Quixaba, Frei Martinho-PB, do Rio Quinturará, Frei Martinho-PB e do Açude Acauã, Itatuba-PB, e ao que tudo indica está parece este parece ser o primeiro registro espécie para o Estado da Paraíba.

c) *Rhabdoderma lineare* Schmidle & Lauterborn in Schmidle 1900 (Ordem: Ordem Synechococcales; Família Synechococcaceae). Prancha II - Figura a.

**Descrição:** Sant'Anna et al. (2004) descrevem esta espécie como apresentando colônias arredondadas ou alongadas com células dispostas mais ou menos em linha, mucilagem hialina, firme e células verde-azuladas com aérotomos, cilíndricas, com as extremidades arredondadas e comprimento variando de 3,2 a 6µm e diâmetro de 1 a 1,8 µm.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada no Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003; SANT'ANNA et al., 2004) em reservatório oligotrófico do Estado de São Paulo (HONDA; AZEVEDO, 2004 FERRAGUT et al., 2005); na região metropolitana de São Paulo (GENTIL, 2007); na Lagoa Mãe-Bá, Guarapari – ES (SOUZA, 2008); em um tributário do Reservatório de Rosana, Ribeirão do Corvo-PR (FELISBERTO; RODRIGUES, 2010); em um braço do reservatório de Salto Caxias, região Sudoeste do Estado do Paraná (BARTOZEK, 2012). Esta espécie foi isolada do Barreiro Sacramento, Frei Martinho-PB, e ao que tudo indica é a primeira ocorrência para o Estado da Paraíba.

### 5.1.2.2 Clorofíceas

a) *Desmodesmus sp cf costato-granulatus* Hegewald & Tsarenko in Tsarenko, Hegewald & Braband 2005 (Classe Chlorophyta; Ordem Sphaeropleales) Prancha I- Figura a.

**Descrição:** Células solitárias com cloroplasto parietal com um pirenoide. Células com aproximadamente 2µm de comprimento. Apresenta 4 espinhos nas laterais, mas nem sempre visíveis.

**Comentários:** Os exemplares da cepa D26Z têm características próximas de *Desmodesmus costato-graulatus* sendo muito parecidas em forma e tamanho com a cepa H542 da CAUP (Culture Collection of Algae of Charles University of Prague) (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/1226>) com a qual apresenta grande semelhança na forma, mas sendo ligeiramente inferior em tamanho. Hentschke e Torgan (2010) citaram para o estado do Rio Grande do Sul pela primeira vez a espécie *Desmodesmus costato-granulatus* var. *elegans*, e esta pode ser a primeira citação desta espécie para o estado da Paraíba.

b) *Chlorococcum* cf. *hynosporum* Starr 1955 (Ordem Chlamydomonadales; Família Chlorococcaceae). Prancha II- Figuras b, c, d.

**Descrição:** De acordo com Fernandes (2008) esta espécie apresenta indivíduos isolados e células adultas esféricas ou quase esféricas medindo de 12,2 a 15,6 µm diâmetro e com um cloroplastídeo parietal, poculiforme a urceolado, com a porção basal um tanto excêntrica. Possui um pirenóide um pouco excêntrico ou deslocado para a parede celular, sendo a mesma delicada.

**Comentários:** Cardoso (1979) efetuou o inventário florístico das algas que ocorrem na lagoa de estabilização de São José dos Campos, no Estado de São Paulo e inclui esta espécie e Carvalho (2003) reportou sua ocorrência em estudo sobre a comunidade fitoplanctônica de reservatórios do Estado de São Paulo. Esta espécie foi isolada do Açude do Cais e do Olho D'água da Bica em Cuité-PB e do Rio Quinturaré, Frei Martinho-PB e ao que tudo indica parece ser a primeira ocorrência registrada para o Estado da Paraíba.

c) *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat, 1914 (Ordem Sphaeropleales; Família Scenedesmaceae). Prancha III- Figuras a, b, c.

**Descrição:** Rosini et al. (2013) descrevem esta espécie como apresentando cenóbios formados por 4 a 8 células dispostas linearmente ou levemente alternadas, sendo que as células são unidas através das regiões medianas. As células externas são lunadas e as células internas são fusiformes a levemente arcuadas sendo a distância entre os ápices de 12,1 a 29,9 µm de comprimento e diâmetro de 2,4 a 4,8 µm. Cloroplasto parietal com um pirenóide.

**Comentários:** esta espécie tem sido encontrada no Lago Água Preta, Belém, Pará (MARTINS-DA-SILVA, 1997); no Reservatório de Corumbá, Goiás (FELISBERTO et al., 2001); em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); na Foz dos rios formadores do Delta do Jacuí, RS (RODRIGUES, 2004); na Represa do Cascão, Salvador-BA (ALCÂNTARA et al., 2011); no Lago Municipal de Cascavel, Paraná (MORESCO; BUENO, 2007); no Reservatório de Mundaú, PE (DANTAS et al., 2008); no Reservatório da Hidroelétrica de Boa Esperança, PI/MA (MENDONÇA, 2009); nas Represas Billings e Guarapiranga – SP (RODRIGUES et al., 2010); em um tributário do Reservatório de Rosana, Ribeirão do Corvo –PR (FELISBERTO; RODRIGUES, 2010); na Lagoa do Casamento e do Butiazal de Tapes, RS (TORGAN; HENTSCHE, 2011); na Lagoa Solon de Lucena, João Pessoa-PB (COSTA E DANTAS, 2011); em um sistema piloto de uma Unidade de Tratamento de Esgoto em Viçosa, MG (MAGALHÃES, 2011); em um braço do reservatório de Salto Caxias, região Sudoeste do Estado do Paraná (BARTOZEK, 2012); e em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo (ROSINI et al., 2013b).

**d) *Pediastrum tetras*** (Ehrenberg). Ralfs, 1845 (Ordem Sphaeropleales; Família Hydrodictyaceae). Prancha III- Figura d.

**Descrição:** Felisberto et al. (2001) descrevem esta espécie como apresentando cenóbios arredondados ou quadráticos, com 4 a 8 células sendo que as células externas apresentam uma incisão formando dois processos voltados para fora do cenóbio. A parede celular é lisa, o cloroplasto é único e parietal, com um pirenóide. As células de variam de 2,87 a 6,26 de comprimento por 5,22 a 8,35 µm de largura.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada no reservatório de Corumbá, Goiás (SILVA et al., 2001; FELISBERTO et al., 2001); em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); no Reservatório Piraquara I, Paraná (COQUEMALA, 2003); na Foz dos rios formadores do Delta do Jacuí, RS (RODRIGUES, 2004); no Lago do IAG, São Paulo (FERRAGUT et al., 2005); no Rio Paranapanema, São Paulo- SP (HENRY et al., 2006); no Reservatório de Barra Bonita, São Paulo-SP (DELLAMANO-OLIVEIRA, 2006); na Lagoa Bonita –DF (GOMES, 2007); no reservatório da Hidroelétrica de Boa Esperança – PI/MA (MENDONÇA, 2009); em um tributário do Reservatório de Rosana, Ribeirão do Corvo –PR (FELISBERTO; RODRIGUES, 2010). Em estudo sobre diversidade da comunidade

fitoplanctônica em diferentes ecossistemas aquáticos urbanos da região metropolitana de João Pessoa-PB; Costa e Dantas (2011) reportaram a sua ocorrência na Lagoa Sólton de Lucena.

e) *Lagerheimia longiseta* (Lemmermann). Printz, 1913 (Ordem Chlorellales; Família Oocystaceae). Prancha III – Figuras e, f.

**Descrição:** Segundo Rodrigues (2008) esta espécie apresenta células solitárias, elípticas, medindo de 11,0 a 14,0 µm de comprimento por 5,5 a 8,0µm de largura, com polos levemente atenuados. Cada polo apresenta de 3 a 5 setas, longas, levemente flexuosas, afinando gradualmente em direção ao ápice. O cloroplasto é parietal e o pirenoide não observado.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada no estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA, 1996); nas Represas Billings e Guarapiranga, São Paulo (RODRIGUES, 2008); e Rodrigues et al., (2010) também a encontraram na represa Guarapiranga – SP. Esta espécie foi isolada do Açude Malhada Limpa, Currais Novos- RN, e ao que tudo indica esta parece ser a primeira ocorrência registrada para esta espécie no Estado do Rio Grande do Norte.

f) *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová in Fott 1969 (Ordem Sphaeropleales; Família Selenastraceae). Prancha IV- Figuras a.

**Descrição:** Rodrigues (2008) descrevem esta espécie como apresentando células solitárias, fusiformes, helicoidais com 1 ou 1,5 voltas, afinando gradualmente em direção aos ápices. Os polos são pontiagudos e as distâncias entre os ápices variam de 19,0 a 25,0 µm. As células medem de 1,2 a 1,5 µm de largura, o cloroplasto é único, parietal e sem pirenoide.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada no reservatório de Corumbá, Goiás (FELISBERTO et al., 2001); no Rio Parnaíba, Estado do Piauí (CÂMARA et al., 2002); em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); na foz dos rios formadores do delta do Jacuí, RS (RODRIGUES, 2004); no reservatório Duas Unas, Jaboatão dos Guararapes, PE (MOURA et al., 2007); no reservatório de Mundaú, PE (DANTAS et al., 2008); em um tributário do reservatório de Rosana, Ribeirão do Corvo–PR (FELISBERTO; RODRIGUES, 2010); na Represa Guarapiranga – SP (RODRIGUES et al., 2010); na Lagoa Solon de Lucena e no reservatório das Águas Minerais de João Pessoa, PB (COSTA; DANTAS, 2011); no Reservatório Itupararanga, SP (CUNHA; CALIJURI, 2011); em um sistema piloto de uma Unidade de Tratamento de Esgoto em Viçosa, MG (MAGALHÃES,

2011); no Canal do Piraquê, Lagoa Rodrigo de Freitas, Sudeste do Brasil (MENEZES et al., 2012); no Pantanal dos Maribus, Chapada Diamantina, BA (RAMOS et al, 2012); no reservatório de Acauã, PB (VANDERLEI, 2013); no Lago Reis, Roraima (SILVA et al., 2013); na Bacia do Paraíba onde encontram-se reservatórios e rios da região semiárida do estado da Paraíba (MASCARENHAS et al., 2013).

**g)** *Scenedesmus acutus* Meyen, 1829 (Ordem Sphaeropleales; Família Scenedesmaceae). Prancha IV - Figura b.

**Descrição:** De acordo com Felisberto et al. (2001) esta espécie apresenta cenóbios planos com 4 a 8 células dispostas em séries alternadas ou linearmente. As células externas são retas com margem externa às vezes levemente convexa. As células internas são retas, oblongas, com polos pontiagudos truncados e parede celular lisa. Apresentam comprimento variando de 10,44 a 18,27  $\mu\text{m}$  e largura de 2,61 a 5,22  $\mu\text{m}$ .

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada no reservatório de Corumbá, Goiás (FELISBERTO et al., 2001); em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); no Lago Municipal de Cascavel, Paraná (MORESCO; BUENO, 2007); no reservatório de Mundaú, PE (DANTAS et al., 2008); no reservatório da hidrelétrica de Boa Esperança, PI/MA (MENDONÇA, 2009); em um tributário do reservatório de Rosana, Ribeirão do Corvo-PR (FELISBERTO; RODRIGUES, 2010); na represa do Cascão, Salvador-BA (ALCÂNTARA et al., 2011); na lagoa do Casamento e do Butiazal de Tapes, RS (TORGAN; HENTSCHKE 2011); em um sistema piloto de uma unidade de tratamento de esgoto em Viçosa, MG (MAGALHÃES, 2011). Esta espécie foi isolada do Açude Quinturaré, Frei Martinho-PB e ao que tudo indica esta parece ser a primeira ocorrência registrada para o Estado da Paraíba.

**h)** *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing 1834 (Ordem Sphaeropleales; Família Scenedesmaceae). Prancha IV- Figura c.

**Descrição:** Segundo Magalhães (2011) esta espécie apresenta cenóbios planos formados por 4 a 8 células que podem ser ligeiramente ou completamente fusiformes. As células possuem comprimento variando de 6,5 a 31,0  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 1,9 a 6,7  $\mu\text{m}$ , sendo que as células externas são lunadas e convexas na margem externa que não sobrepõe à linha dos polos. Os

polos são pontiagudos e as células são alinhadas ou levemente alternadas em uma fileira. O cloroplastídeo é parietal e possui um pirenoide.

**Comentários:** Esta espécie foi encontrada previamente em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); no estuário do Rio Igarassu, PE, (LEÃO, 2004); na foz dos rios formadores do delta do Jacuí, RS (RODRIGUES, 2004); no Lago do IAG, São Paulo (FERRAGUT et al., 2005); em um sistema piloto de uma Unidade de Tratamento de Esgoto em Viçosa, MG (MAGALHÃES, 2011). Esta espécie foi isolada do Açude Malhada Limpa, Currais Novos- RN, e ao que parece esta é a primeira ocorrência para o estado do Rio Grande do Norte.

i) *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson in Brébisson & Godey 1835 (Ordem Sphaeropleales; Família Scenedesmaceae). Prancha IV - Figura d.

**Descrição:** Martins-da-Silva (1997) apresentam esta espécie como possuindo um cenóbio reto, linear, com 4 a 8 células oblongas medindo de 9 a 23  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2,5 a 10  $\mu\text{m}$  de largura com polos arredondados, margem externa das células externas retas à ligeiramente convexas, 1 espinho curvo em cada polo medindo de 2,3 a 20  $\mu\text{m}$ , dispostos diagonalmente. O cloroplastídeo é único, parietal, com um pirenoide.

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada no Lago Água Preta, Belém, Pará (MARTINS-DA-SILVA, 1997); no reservatório de Corumbá, Goiás (FELISBERTO; RODRIGUES; LEANDRINI 2001); em reservatórios do Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003); no Estuário do Rio Igarassu, PE (LEÃO, 2004); na foz dos rios formadores do Delta do Jacuí, RS (RODRIGUES, 2004); no Lago do IAG, São Paulo (FERRAGUT et al., 2005); no reservatório de Mundaú, PE (DANTAS et al., 2008); no reservatório da Hidrelétrica de Boa Esperança, PI/MA (MENDONÇA, 2009); na represa do Cascão, Salvador-BA (ALCÂNTARA et al., 2011); na Lagoa Solon de Lucena e no Rio Jaguaribe, João Pessoa-PB (COSTA; DANTAS, 2011); na bacia hidrográfica do rio Paraíba, PB (MASCARENHAS et al., 2013). Esta espécie foi isolada do Açude Malhada Limpa, Currais Novos- RN, e ao que parece esta é a primeira ocorrência para o estado do Rio Grande do Norte.

j) *Hariotrina reticulata* Dangeard 1889 (Ordem Sphaeropleales; Família Scenedesmaceae) Prancha IV - Figura e.

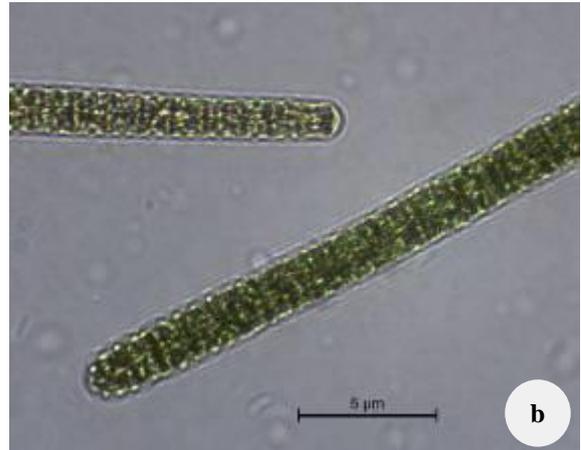
**Descrição:** Segundo Domingues e Torgan (2012) esta espécie apresenta cenóbios esféricos com 8 a 16 células, podendo formar cenóbios múltiplos. As células são esféricas e envoltas por bainha mucilaginosa, conectadas umas às outras por interligações mucilaginosas. Os espaços intercelulares são triangulares. Cada célula possui de 5 a 6 interligações mucilaginosas. O cloroplasto é parietal com um pirenoide. Diâmetro celular de 4,5 a 7,5  $\mu\text{m}$ .

**Comentários:** Esta espécie tem sido encontrada na Lagoa do Campelo, Campos, RJ (HUSZAR et al., 1988); nas Represas Bilings e Guarapiranga (RODRIGUES, 2008); no Lago dos Tigres, Britânia-GO (ALVES; NOGUEIRA, 2010); em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo (ROSINI, 2010); no município de Palhoça, SC (CORRÊA, 2011); no lago das Tartarugas, Porto Alegre-RS (DOMINGUES; TORGAN, 2012). Esta espécie foi isolada açude Malhada Limpa, Currais Novos- RN, e ao que parece esta é a primeira ocorrência para o estado do Rio Grande do Norte.

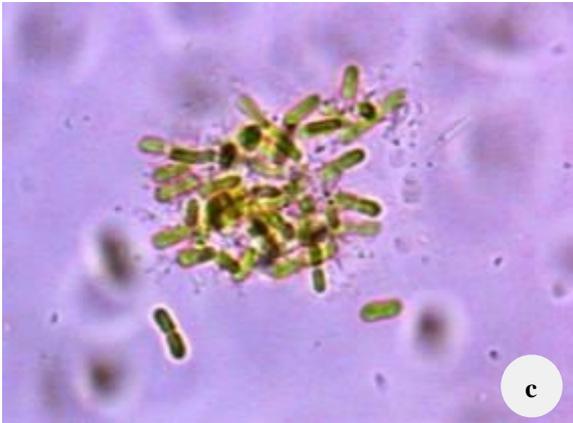
**Prancha I** – Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. Figura a: *Desmodesmus* sp cf *costato-granulatus*, Figura b: *Planktothrix isothrix* Figuras c, d, e, f: *Synechococcus nidulans*.



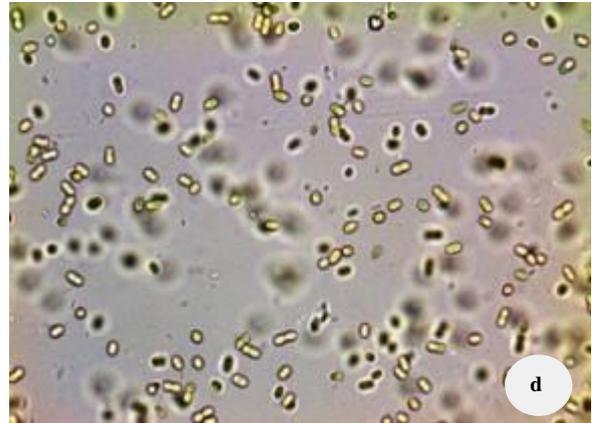
Cepa D26Z – Aumento 1000x



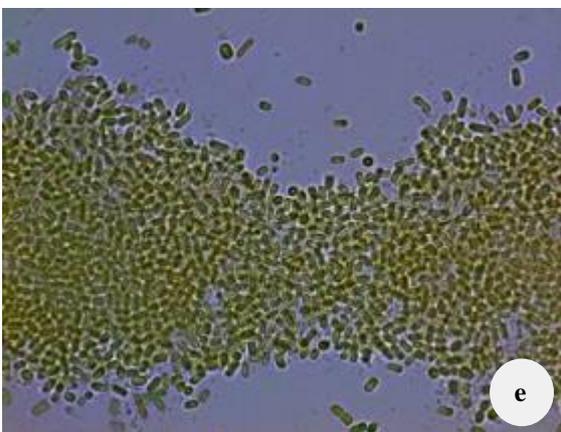
Cepa D39Z- Aumento 1000x



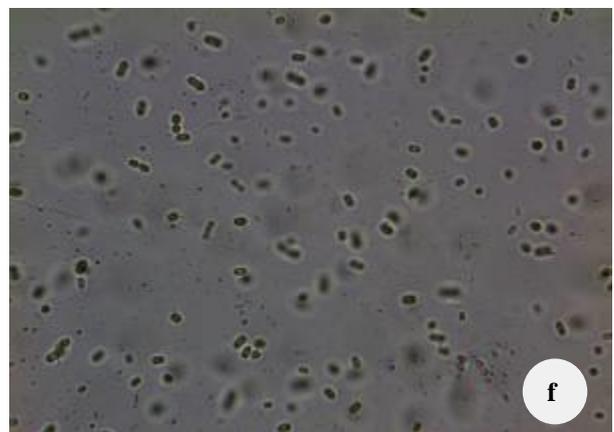
Cepa D40Z- Aumento 1000x



Cepa D46Z- Aumento 1000x

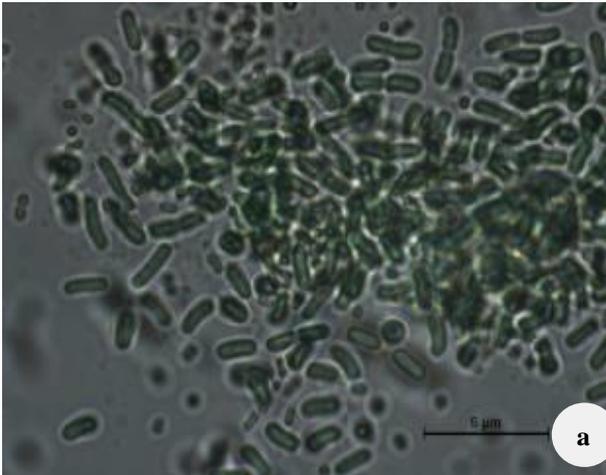


Cepa D82Z- Aumento 1000x



Cepa D112Z- Aumento 1000x

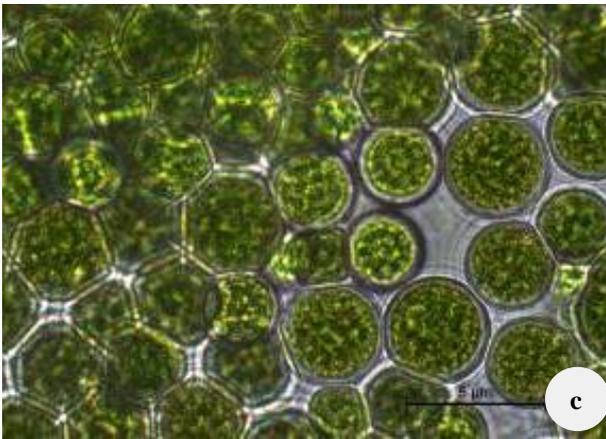
**Prancha II** - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. Figura a: *Rhabdoderma lineare*, Figuras b, c, d: *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, Figuras e, f: Clorofíceas não identificadas.



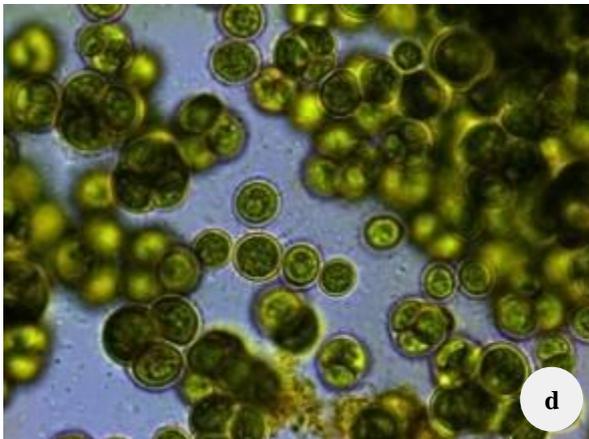
Cepa D74Z –Aumento 1000x



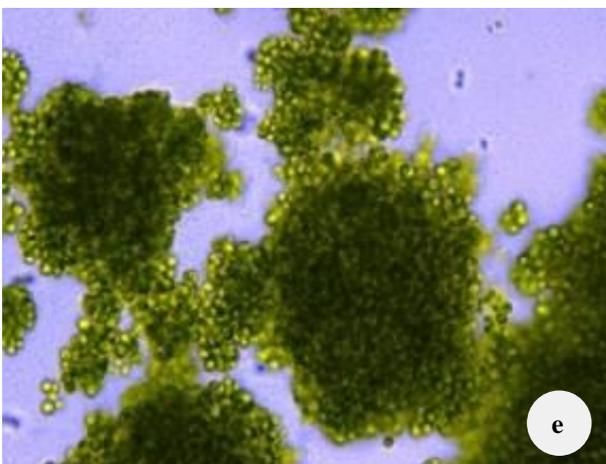
Cepa D28Z- Aumento: 1000x



Cepa D37Z-Aumento 1000x



Cepa D76Z- Aumento 1000x

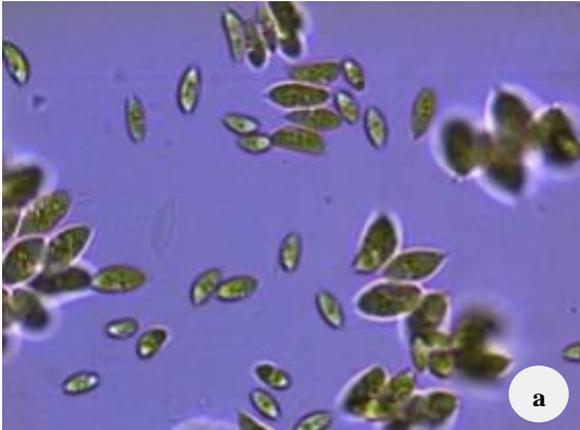


Cepa D68Z- Aumento 400x

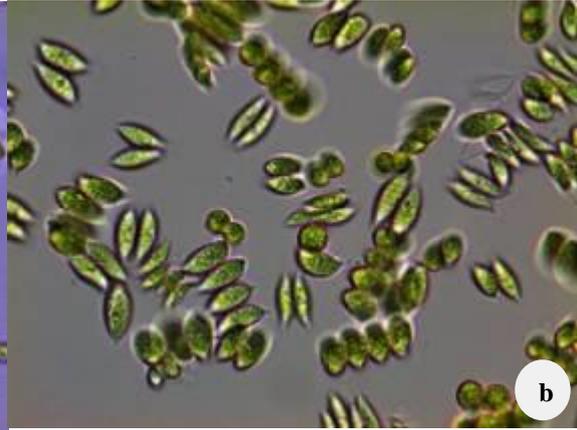


Cepa D29Z- Aumento 1000x

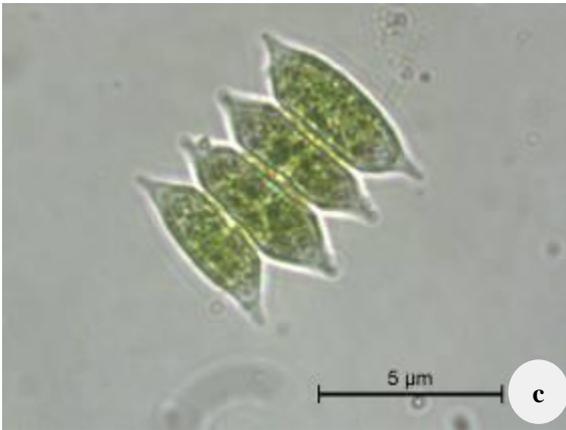
**Prancha III** - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. Figuras a, b, c: *Scenedesmus acuminatus*, Figura d: *Pediastrum tetras*, Figuras e, f: *Lagerheimia longiseta*



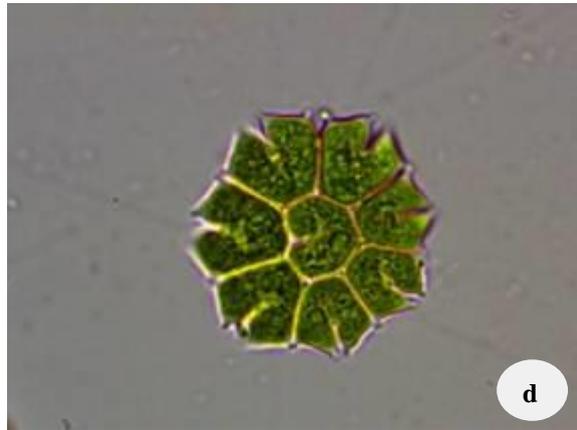
Cepa D115WC- Aumento 1000x



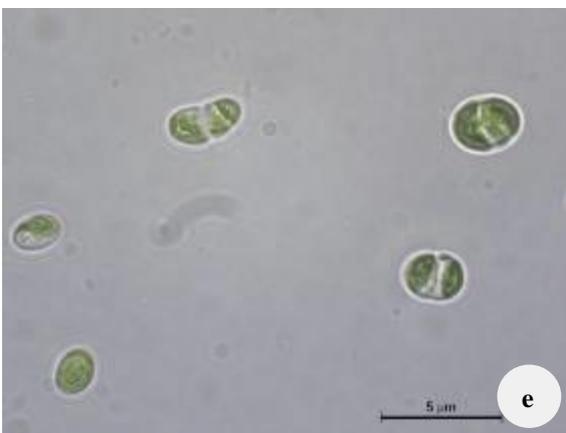
Cepa D117WC – Aumento 1000x



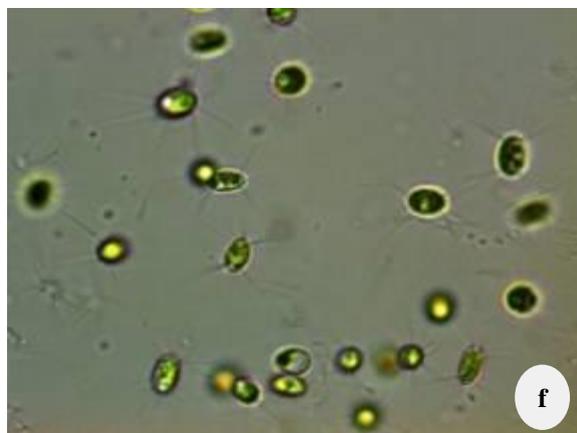
Cepa D120WC- Aumento 1000x



Cepa D121WC – Aumento 1000x

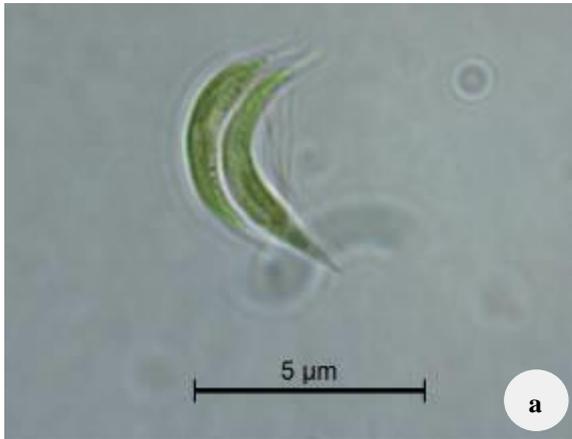


Cepa D123WC – Aumento 1000x

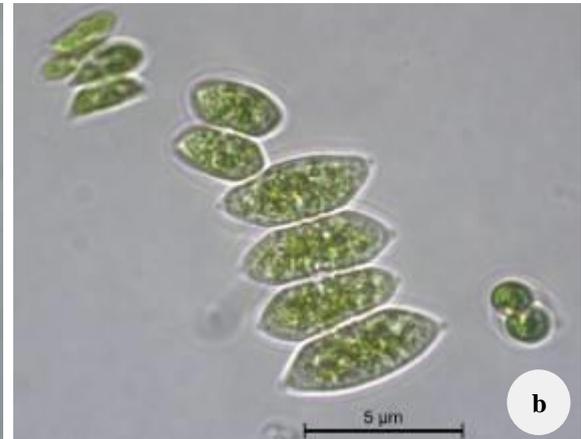


Cepa D133WC – Aumento 1000x

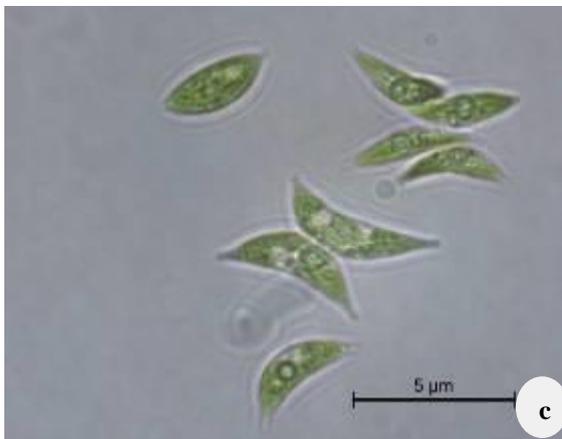
**Prancha IV** - Microalgas isoladas de diferentes habitats dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. Figura a: *Monoraphidium contortum*, Figura b: *Scenedesmus acutus*, Figura c: *Scenedesmus dimorphus*, Figura d: *Scenedesmus quadricauda*, Figura e- *Hariotina reticulata*, Figura f: Clorófitcea não identificada.



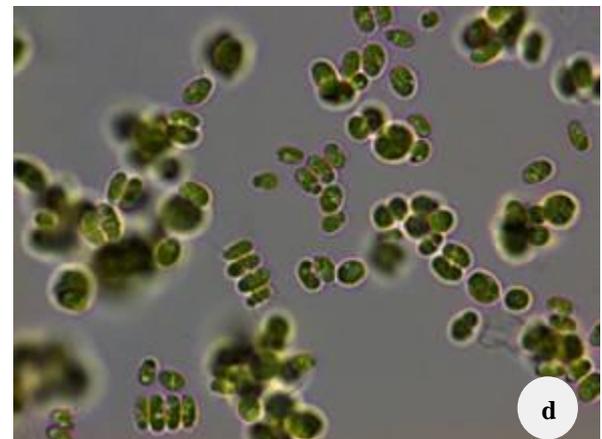
Cepa D124WC- Aumento 1000x



Cepa D126WC – Aumento 1000x



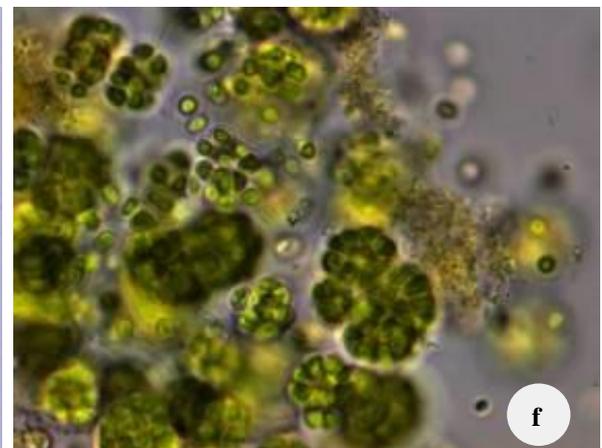
Cepa D134WC – Aumento 1000x



Cepa D142WC – Aumento 1000x



Cepa D147WC – Aumento 1000x



Cepa D73WC - Aumento 1000x

### 5.1.3 Cultivo das microalgas isoladas do Bioma Caatinga visando à produção de biomassa e análises de ácidos graxos

Das 24 cepas de microalgas isoladas das amostras coletadas na região semiárida dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte foram cultivadas 14 cepas em meio sintético e em condições laboratoriais controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas) visando à produção de biomassa para análises dos ácidos graxos (Tabela 8).

**Tabela 8-** Constante de crescimento  $k$  (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g) e totais de ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g) das microalgas dos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte.

Código da cepa	$k$ (média e desvio padrão)	Duração da fase Log (dias)	Biomassa (g/L)	Rendimento relativo em ésteres de ácidos graxos em relação à soja (mg/g)
D26Z	0,21±0,06	4	0,52	81,80
D28Z	0,32±0,05	2	0,75	9,25
D29Z	0,25±0,09	4	0,67	120,00
D37Z	0,51±0,25	4	0,49	109,00
D39Z	0,33±0,12	4	0,63	78,0
D40Z	0,41±0,08	2	0,54	18,70
D46Z	0,16±0,01	2	0,38	94,00
D68Z	0,64±0,14	2	0,30	113,00
D74Z	0,51±0,10	8	0,32	0,98
D76Z	0,30±0,04	2	0,64	120,4
D82Z	0,41±0,06	3	0,39	83,48
D112Z	0,71±0,45	6	0,63	113,6
D115WC	0,60±0,13	4	0,45	415,65
D133WC	0,54±0,37	8	0,17	305,59

Considerando-se os valores médios da constante de crescimento ( $k$ ), observa-se que houve diferença entre as espécies, com valor máximo de 0,71 divisões/dia para a cepa D112Z (*Synechococcus nidulans*) e valor mínimo de 0,16 divisões/dia para a cepa D46Z (*Scenedesmus acutus*). As cepas D74Z (*Rhabdoderma lineare*) e D133WC (*Lagerheimia longiseta*) foram as que apresentaram fase exponencial mais longa (8 dias), enquanto as cepas D28Z e D76Z (clones de *Chlorococcum cf. hypnosporum*), D40Z e D46Z (clones de *Synechococcus nidulans*) e D68Z (clorófitas não identificadas) foram as que apresentaram as menores durações da fase log (2 dias).

Quanto a biomassa total e os teores de ácidos graxos também houve diferença entre as espécies, sendo o maior rendimento final em biomassa encontrado nas cepas D28Z (*Chlorococcum cf. hypnosporum*), com 0,75g/L e D29Z (clorófitas não identificadas), com 0,67g/L, e os maiores teores de ácidos graxos em relação ao rendimento da soja, encontrados nas cepas D115WC (*Scenedesmus acuminatus*), com 415,65mg/g D133WC (*Lagerheimia longiseta*) com 305,59 mg/g e D112Z (*Synechococcus nidulans*), com 113,6 mg/g. Verifica-

se, nos dados apresentados, que a concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos não segue o mesmo padrão que o rendimento em biomassa, sugerindo que a quantidade de biomassa e o conteúdo lipídico não estão correlacionados. Dados semelhantes foram apresentados por Rodolphi et al., (2008), Sheehan et al., (1998) e Oliveira (2013).

Clones da espécie *Chlorococcum* cf. *hypnosporum* (D28Z, D37Z, D76Z) mostraram variações nos valores médios do  $k$  (de 0,30 a 0,51), nas quantidades totais de biomassa (0,49 g/L a 0,75 g/L) e nos totais de ácidos graxos (9,25mg/g a 120,4mg/g), e clones da espécie *Synechococcus nidulans* (D40Z, D46Z, D82Z e D112Z) mostraram variação nos valores médios do  $k$  de 0,16 a 0,71, nas quantidades totais de biomassa (0,38 g/L a 0,63 g/L) e nos totais de ácidos graxos (18,70mg/g a 113,6mg/g em relação à soja), ressaltando-se que o clone D112WC (*S. nidulans*) também apresentou o maior tempo de duração da fase log (6 dias). Esses dados são surpreendentes, visto que tanto podem refletir as condições do habitat de onde a espécie foi isolada, como as condições fisiológicas e metabólicas de cada clone no momento do seu isolamento.

No caso específico da cianobactéria *Synechococcus nidulans* dois clones (D112Z e D82Z) isolados de um mesmo habitat (Açude Quixaba, município de Frei Martinho, PB), as duas cepas mostraram grandes diferenças nos parâmetros de crescimento e no total de biomassa produzido, e o total de ácidos graxos chegou a ser de aproximadamente 1,36x maior na cepa D112Z. O mesmo aconteceu com a espécie *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, tendo-se verificado que o total de ácidos graxos da cepa D37Z foi 11,7x maior do que na cepa D28Z, ambas isoladas do açude do Caís, município de Cuité, PB.

Salienta-se que os teores de ésteres obtidos por cada espécie tiveram seus cultivos desenvolvidos em condições ideais (fotoperíodo constante de 12 horas e temperatura de 25 °C  $\pm$  1 °C). Sob condições de estresse é possível induzir a produção e aumentar o teor de lipídeos, pois a composição bioquímica das microalgas depende da espécie, do sistema de cultivo utilizado, da temperatura, da luminosidade da salinidade, do pH e das formulações dos meios de cultura (MIAO; WU, 2004; BROWN et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2009; CARDOSO et al., 2011).

A composição bioquímica das microalgas não é totalmente conhecida mediante a infinidade de espécies ainda não estudadas sob este foco o que faz delas apresentarem uma fonte ilimitada de diversos produtos de interesse biotecnológico (PULZ; GROSS, 2004; DERNER, 2006; BAUMGARTNER et al, 2013), muito embora o interesse comercial que pode ser obtido delas é algo imprevisível. Muitos trabalhos têm sido realizados visando à procura por espécies que não somente sejam promissoras para tal interesse, mas que também

tenham elevado potencial em produtividade de biomassa (RICHMOND, 2004). Entretanto, ainda são necessários mais esforços para a busca por espécies e por condições de cultivo que permitam o acúmulo dos compostos de interesse, bem como a busca por medidas que visem à redução dos custos de sua produção com aumento de produtividade em biomassa.

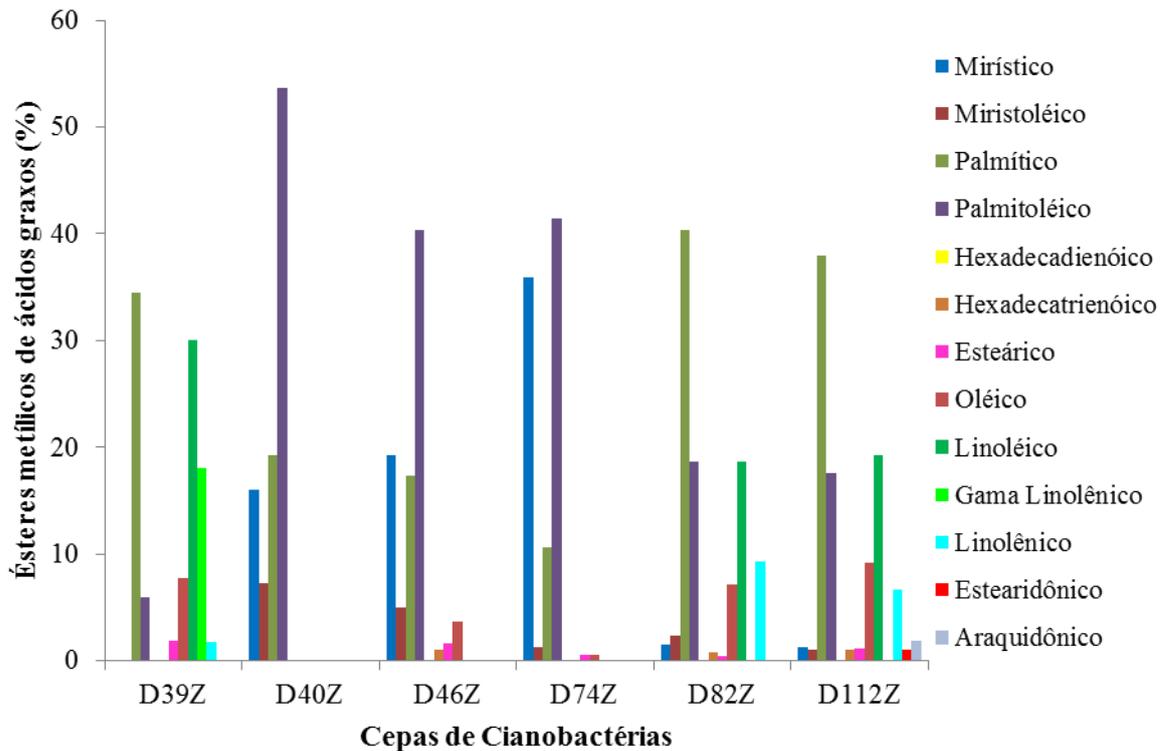
#### 5.1.4 Perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos

As análises cromatográficas efetuadas na biomassa das espécies cultivadas evidenciaram um perfil diversificado dos ésteres metílicos de ácidos graxos (APÊNDICE C) entre cianobactérias (Figura 1) e clorofíceas (Figura 2).

Nas cianobactérias (Figura 1) os tipos de ácidos graxos variaram entre os clones de *Synechococcus nidulans* de 4 tipos na cepa D40Z a 14 tipos nas cepas D82Z e D112Z. Houve predominância do ácido palmítico com maiores percentuais nas cepas D39Z (*Planktothrix isothrix*) e nos clones de *S. nidulans* D82Z e D112Z e do ácido palmitoleico, com maiores percentuais nas cepas D40Z e D46Z (clones de *S. nidulans*) e D74Z (*Rhabdoderma lineare*). O ácido mirístico só foi encontrado nas cepas D40Z e D46Z (clones de *S. nidulans*) e D74Z (*R. lineare*). A cepa D39Z (*Planktothrix isothrix*) apresentou os maiores percentuais para os ácidos linoleico e gama linolênico. O ácido araquidônico foi registrado na cepa D112Z (*S. nidulans*) em baixíssimo percentual.

Outros cultivos realizados com *S. nidulans* também apresentaram valores consideráveis do ácido palmitoléico (MASLOVA et al., 2004; RADMAN; COSTA, 2008). Patil et al. (2007) realizou um cultivo de *Synechococcus* sp. e na análise dos ácidos graxos constaram que os mais abundantes eram o mirístico, o palmítico e o palmitoléico. Protoomyot et al. (2005) encontraram para *Synechococcus* sp elevado teor de ácido palmítico (ácido saturado), bem como de ácidos monoinsaturados, porém baixos teores de ácidos poliinsaturados, o que parece ser característico do gênero *Synechococcus* e das cianobactérias em geral.

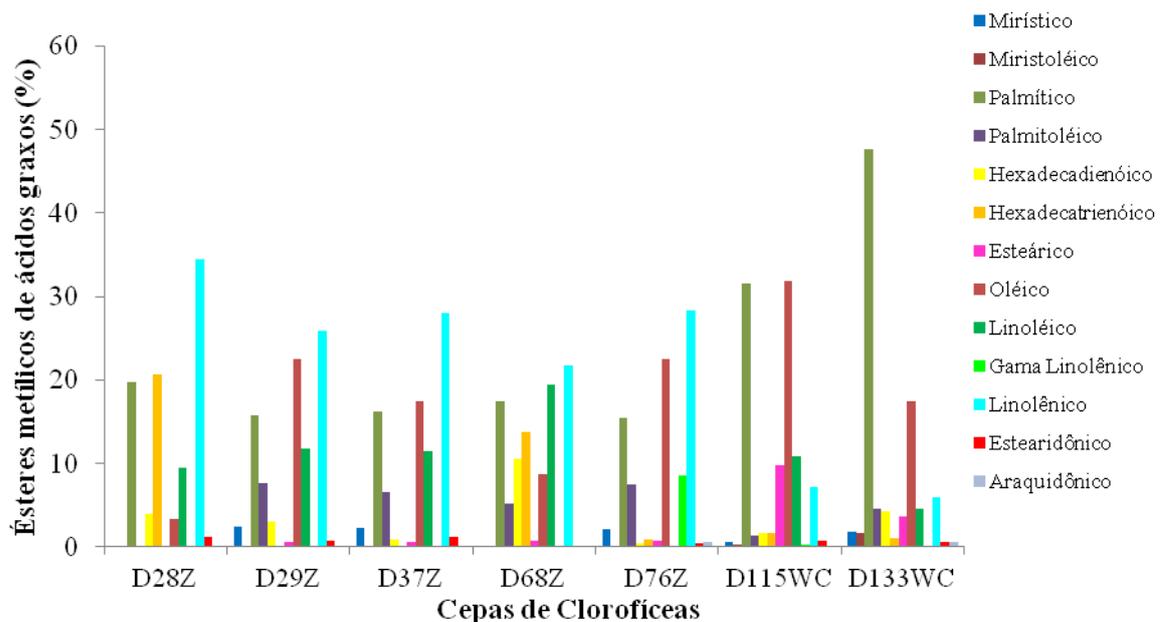
**Figura 1-** Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para as cepas de cianobactérias cultivadas.



No grupo das clorófitas (Figura 2) três ácidos foram predominantes: o palmítico, com maiores percentuais nas cepas D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) e D133WC (*Lagerheimia longiseta*); o oleico, com maiores percentuais nas cepas D115WC (*Scenedesmus acuminatus*), D29Z (não identificada) e D76Z (*Chlorococcum cf hypnosporum*); e o linolênico, com maiores percentuais nas cepas D28Z, D37Z e D76Z (clones de *Chlorococcum cf hypnosporum*). A cepa D28Z apresentou elevado percentual para o ácido hexadecatrienóico e o ácido araquidônico foi apresentado em baixos percentuais pelas cepas D76Z (*Chlorococcum cf hypnosporum*) e D133WC (*Lagerheimia longiseta*).

Na literatura são encontrados trabalhos realizados com espécies do gênero *Scenedesmus* que obtiveram valores consideráveis de ácido palmítico, palmitoléico e oléico e linoléico e, em resumo, apresentaram elevados teores de ácidos saturados e monoinsaturados e baixos teores de ácidos poliinsaturados (CHOI et al., 1987; MAKAREVICIENE, 2011; JENA et al., 2012; PRABAKARAN; RAVIDRAN, 2012; OLIVEIRA, 2013). No entanto, espécies diferentes do mesmo gênero podem apresentar variedade em sua composição de ácidos graxos (GHAZALA et al., 2010). Devido à deficiência de ácidos graxos poliinsaturados, as clorófitas geralmente apresentam baixo interesse nutricional (BROWN et al, 1997).

**Figura 2-** Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para as cepas de clorófitas cultivadas.

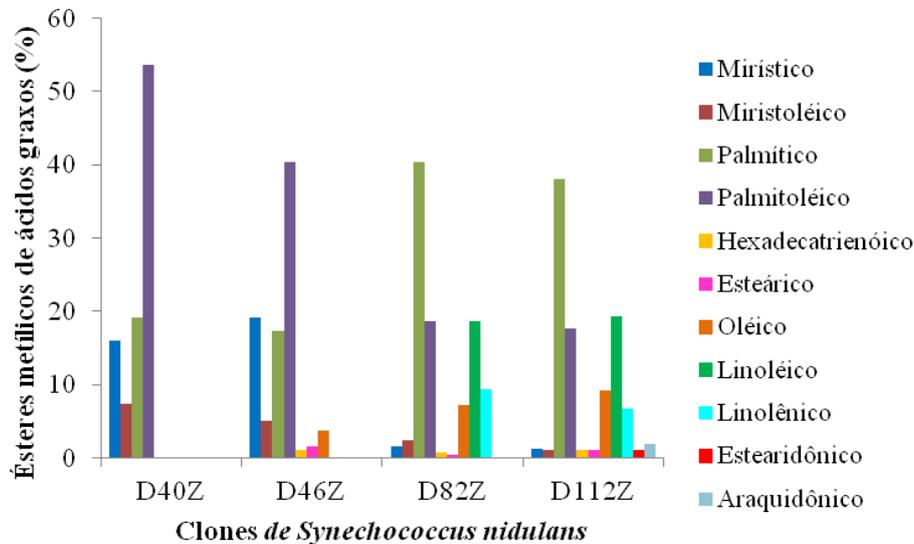


Altos teores do ácido araquidônico não são encontrados em qualquer organismo e são quase excluídos dos lipídeos de microalgas de água doce e marinha (THOMPSON, 1996; BIGOGNO et al., 2007), fato também constatado em nossos dados para as microalgas estudadas.

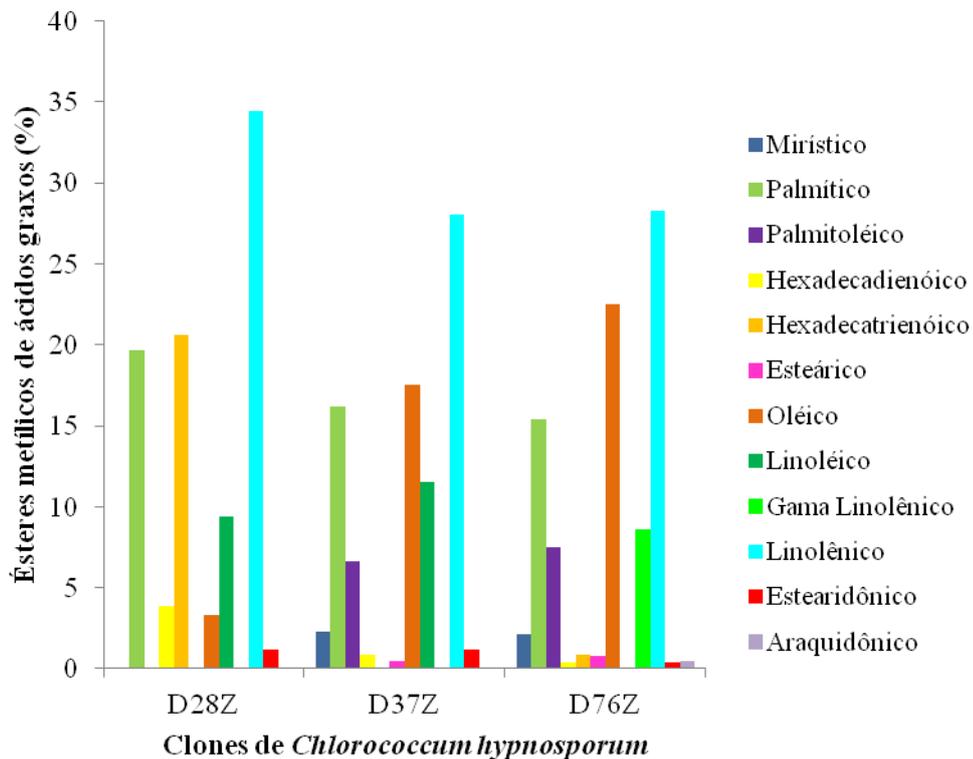
Os ácidos graxos encontrados nas microalgas diferem de acordo com o grupo taxonômico e as condições de crescimento (HU et al., 2008; BROWN, 2002; REZANKA et al., 2003; PRATOOMYOT et al., 2005; CARDOSO et al., 2011) e por essa razão tem se sugerido que o perfil de ácidos graxos poderia ser utilizado como um caráter taxonômico, distinguindo microalgas estreitamente relacionadas a nível de espécie e gênero (TAIPALE et al., 2013). No entanto, constatou-se, nesta pesquisa, que os clones da Clorófitas *Chlorococcum* cf. *hypnosporum* (D28Z, D37Z e D76Z) e da cianobactéria *Synechococcus nidulans* (D40Z, D46Z, D82Z e D112Z) exibiram tipos e teores diversificados dos ácidos graxos (Figuras 3 e 4), sendo que para a espécie *Synechococcus nidulans*, apenas a cepa D112Z apresentou os ácidos estearidônico e araquidônico, enquanto que na espécie *C.* cf. *hypnosporum* apenas a cepa D76Z apresentou os ácidos gama linolênico e araquidônico, porém para esta espécie a ocorrência foi mais homogênea entre os clones. Estes dados nos permitem inferir que os perfis de ácidos podem diferir numa mesma espécie tendo em vista que as cepas D82Z e D112Z foram isoladas do mesmo local. Tal fato contrasta com a observação de Taipale et al. (2013), sugerindo que o uso do perfil dos ácidos graxos como

mais um caráter taxonômico deve ser visto com ressalvas, indicando que mais pesquisas são necessárias a este respeito.

**Figura 3-** Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para os clones de *Synechococcus nidulans*.



**Figura 4-** Diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos para os clones de *Chlorococcum hypnosporum*.



De uma maneira geral, altos níveis de ácidos saturados e ácidos monoinsaturados e baixos de ácidos poliinsaturados são comuns em clorofíceas e cianobactérias (PRATOOMYOT et al., 2005; PEREIRA et al, 2013), embora algumas das espécies de clorofíceas estudadas tenham apresentado elevados teores dos ácidos linoléico e linolênico que são ácidos graxos essenciais.

Os ácidos graxos são constituintes estruturais das membranas celulares, cumprem funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares (VALENZUELA; NIETO, 2003). O ácido palmítico encontrado (saturado) é importante para a alimentação infantil sendo no leite materno em concentrações variando de 20% a 30% (VALENZUELA; NIETO, 2003; SILVA et al., 2007), e o palmitoléico é responsável pelo metabolismo dos lipídeos, além de ser utilizado em cosméticos de ação rejuvenescedora (WHEN; CHEN, 2000). Estes ácidos, juntos ao oleico e mirístico apresentam algumas propriedades físicas e químicas similares às dos óleos vegetais e, portanto, podem ser considerados como uma matéria-prima potencial para a produção de biodiesel (CHISTI, 2007; KIRROLIA et al. 2013).

Em relação aos ésteres metílicos de ácidos graxos e sua aplicação na indústria de alimentos, de cosméticos, e farmacêutica, destacam-se os ácidos graxos da família dos ômega ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9), encontrados em quase todas as espécies estudadas (Tabela 9), exceto para cepa D40Z que não exibiu nenhum percentual. Os maiores percentuais totais foram apresentados pelas cepas D26Z- *Desmodesmus sp cf costato-granulatus* (56,3%), D29Z- não identificada (60%), D37Z – *C. cf hypnosporum* (57%), D39Z- *Planktothrix isoethrix* (57,6%) e D76Z - *C. cf hypnosporum* (59,9%). Destas, a cepa D39Z apresentou 18,1% do ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3 *c6,9,12*) um ácido graxo essencial de alto valor de mercado;

**Tabela 9-** Teores de ácidos ômega 3 ( $\omega$ -3), ômega 6( $\omega$ -6), ômega 9( $\omega$ -9) e total de ômega das microalgas isoladas.

<b>Código da cepa</b>	<b>Ômega 3 (<math>\omega</math>-3) (%)</b>	<b>Ômega 6 (<math>\omega</math>-6) (%)</b>	<b>Ômega 9(<math>\omega</math>-9) (%)</b>	<b>Total de Ômegas (%)</b>
D26Z	26,5	19,2	10,6	56,3
D28Z	9,4	34,4	3,3	47,1
D29Z	25,8	11,7	22,5	60,0
D37Z	28	11,5	17,5	57,0
D39Z	1,7	48,2	7,7	57,6
D40Z	---	---	---	---
D46Z	1,1	6,7	3,7	11,5
D68Z	21,8	19,4	8,7	49,9
D74Z	---	---	0,6	0,6
D76Z	28,3	9,1	22,5	59,9
D82Z	9,3	20,6	7,2	37,1
D112Z	6,7	19,3	9,2	35,2
D115WC	7,1	11,1	31,9	50,1
D133WC	5,9	5,1	17,4	28,4

Os ácidos graxos poliinsaturados de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais (PULZ; GROSS, 2004; BERTOLDI et al., 2008). Até o momento, os extratos de microalgas podem ser encontrados em muitos produtos de cuidados faciais e da pele, por exemplo, em creme antienvelhecimento, produtos de cuidados refrescantes ou regenerativos, creme solar, emoliente e anti-irritação em esfoliantes (FERREIRA et al., 2013).

Em humanos, os ácidos graxos essenciais, linoleico ( $\omega$ -3) e alfa linolênico ( $\omega$ -6) são necessários para manter em condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Por comporem uma classe de moléculas que não podem ser sintetizadas pelo organismo, devem ser obtidas através de fontes dietéticas (CASANOVA; MEDEIROS, 2011).

O consumo de  $\omega$ -3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão (COHEN et al., 2000; VON SHACKC, 2007, 2008; FERREIRA et al., 2013), sendo considerados ainda como componentes essenciais do crescimento de eucarióticos superiores (WARD; SINGH, 2005).

Como produtores primários de ácidos graxos poliinsaturados o uso de microalgas autotróficas para produção em larga escala de ácido ômega-3 tem atraído muito interesse recentemente. Se realizado em larga escala permitirá atender três grandes áreas de importância: saúde humana, produção de energia e segurança alimentar (ADARME-VEGA et al., 2012).

Os ácidos graxos ômega-6, como o linoléico, são essenciais para a saúde humana, porém o consumo de alimentos com alta concentração dos mesmos resulta numa superprodução de eicosanoides, componentes químicos responsáveis por alguns tipos de doenças (LICHTENSTEIN et al., 1994; LOUHERANTA et al., 1996). O ácido araquidônico da família dos ômega-6, é um nutracêutico valioso, sendo um dos principais ácidos graxos dos fosfolipídios celulares do cérebro, precursor de eicosanoides e farmacologicamente importante para dietética e terapêutica (KOLETZKO; BRAUM 1991; HANSEN et al., 1997; MARTIN et al., 2006).

## **5.2 Cultivo de microalgas com potencialidade alimentar e energética utilizando meios alternativos**

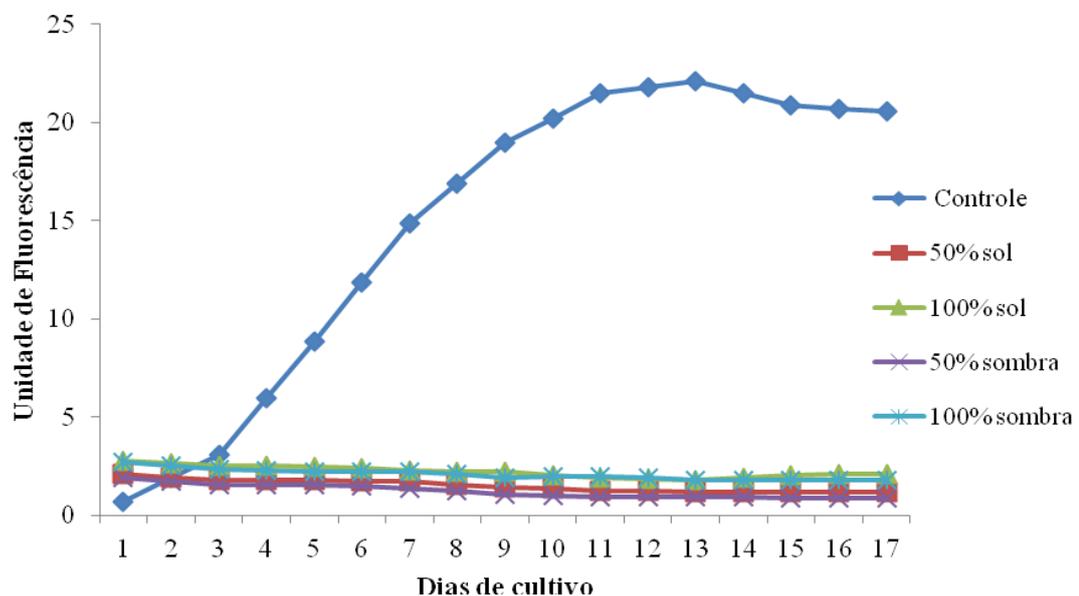
Para a realização dos cultivos em meios alternativos foram escolhidas três espécies com potencialidade alimentar e energética: A cianobactéria *Spirulina platensis* (D9Z), gentilmente cedida pelo Dr. Sérgio Lourenço da Universidade Federal Fluminense, que foi selecionada por ser mundialmente cultivada como um nutracêutico pelo fato de apresentar elevadas concentrações de proteínas e aminoácidos essenciais; a cianobactéria *Planktothrix isothrix* (D39Z), isolada das amostras coletadas na represa de Acauã, PB (Bioma Caatinga) por ter apresentado elevado teor do ácido gama-linolênico (GLA) que é um ácido graxo essencial ômega 6; e a clorofícea *Scenedesmus acuminatus* (D115WC), isolada do bebedouro das ovelhas, município de Frei Martinho-PB (Bioma Caatinga), por ter apresentado elevado teor de ésteres metílicos de ácidos graxos sendo portanto promissora para a produção de biodiesel. Justifica-se a escolha da primeira espécie também pelo fato de se procurar atingir os objetivos d e e deste trabalho que estão voltados para a produção artesanal desta espécie e avaliar sua aceitabilidade de uso e consumo entre agricultores da região semiárida paraibana.

### **5.2.1 Cultivo de microalgas em extrato de solo regado com vinhaça**

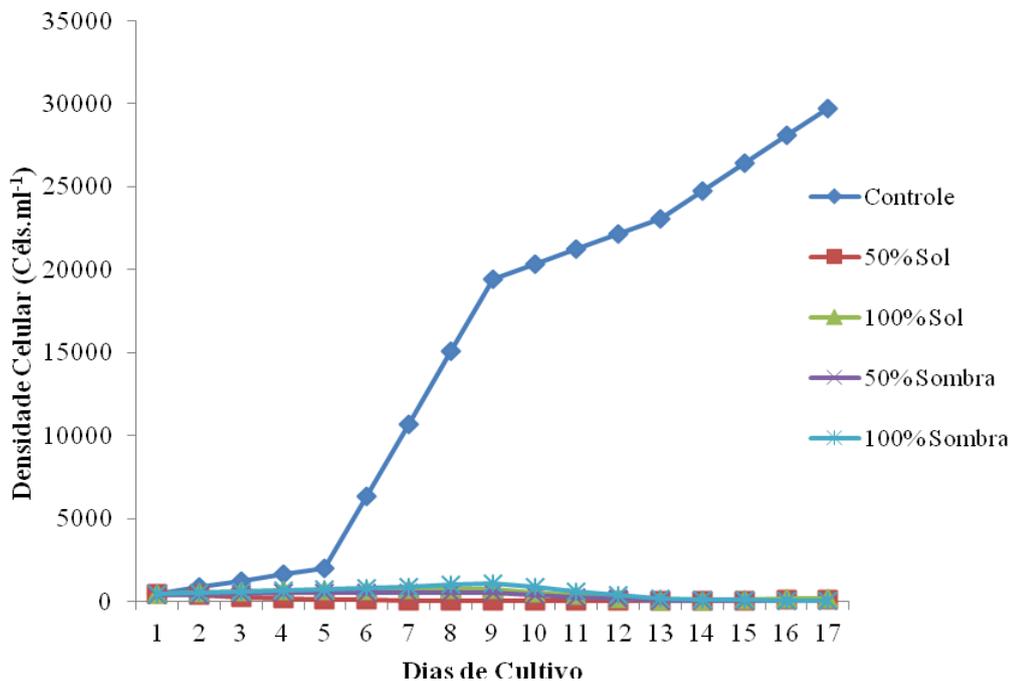
As Figuras 5 e 6 apresentam as curvas de crescimento por unidade de fluorescência e contagem celular para *Spirulina platensis* (D9Z) cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com diferentes concentrações de extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça. Nenhuma das concentrações desses meios alternativos propiciou o crescimento dessa microalga, sugerindo, possivelmente, um forte efeito inibitório

da vinhaça sobre o desenvolvimento dessa espécie. Mesmo considerando que o pH foi ajustado para valores similares ao controle (Meio Zarrouk) e que o uso de extrato de solo como meio de cultura é uma prática que foi estabelecida desde o início de século passado (GROSS, 1937) parece evidente que a ausência de crescimento de *S. platensis* nas condições testadas está relacionada com a presença da vinhaça no meio de cultura testado que é tóxica. Entretanto, há que se ressaltar que não foram feitas análises nos extratos de solo após 30 dias de manutenção do solo no sol e na sombra com adição de vinhaça, de maneira que não se sabe quais as concentrações de nutrientes que estão disponíveis para esta microalga nesses meios alternativos preparados com extrato de canavial regado com vinhaça.

**Figura 5-** Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D9Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.



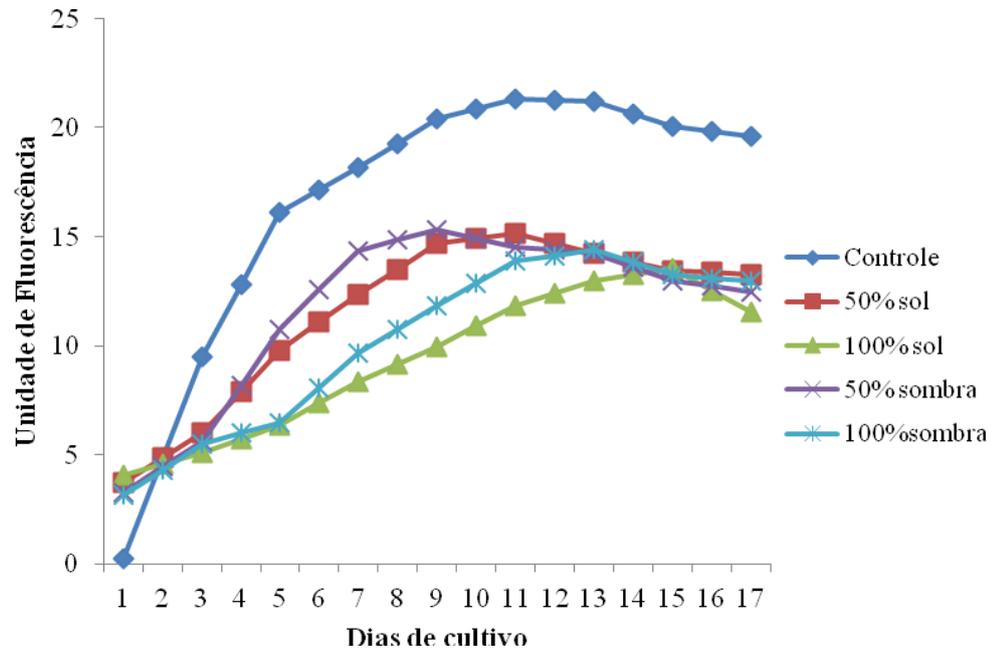
**Figura 6** - Curva de crescimento por contagem celular da cepa D9Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.



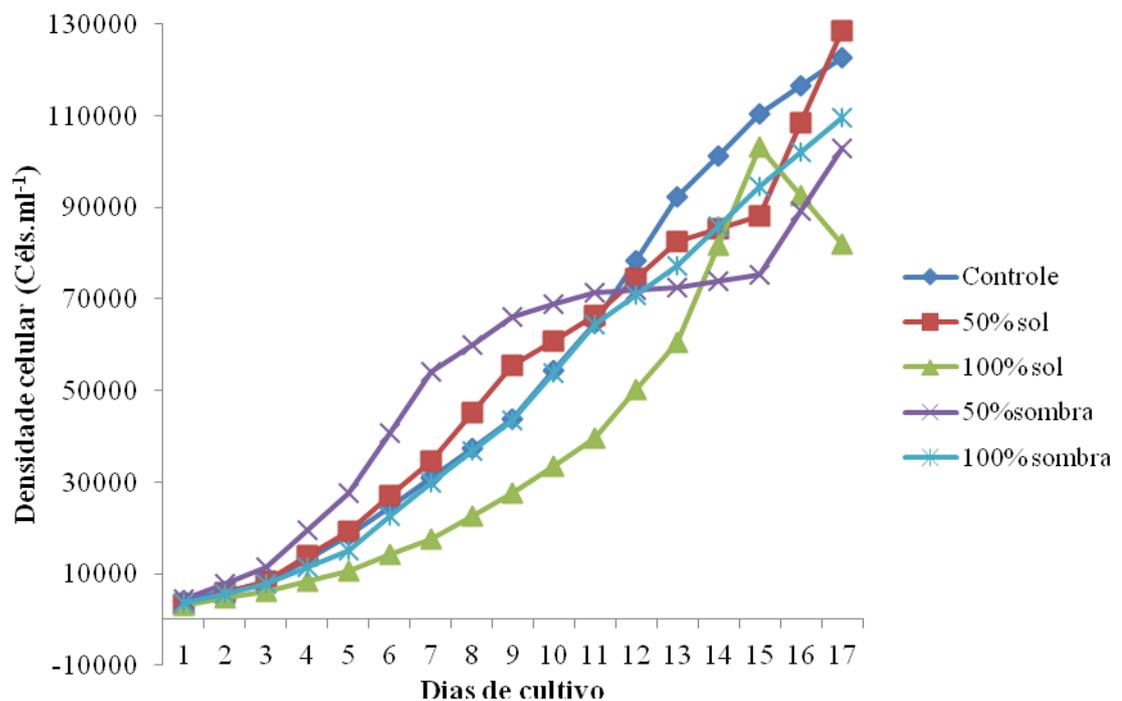
As Figuras 7 e 8 apresentam as curvas de crescimento para a espécie *Planktothrix isothrix* (D39Z) cultivada em meio sintético Zarrouk e com variações de concentração de extrato de solo regado com vinhaça. A curva por unidade de fluorescência (Figura 7) mostra que o crescimento nos frascos contendo as concentrações de 50% de extrato de solo da sombra e 50% de extrato de solo do sol foi elevado (do 4º ao 9º dia de cultivo), sendo um pouco maior no frasco contendo extrato de solo da sombra na concentração 50%, mas nenhuma das concentrações superou o crescimento do cultivo controle em meio Zarrouk.

Já na curva obtida por contagem celular (Figura 8) a concentração de 50% de extrato de solo da sombra superou até mesmo o cultivo controle do 4º ao 11º dia, enquanto que os cultivos controle e em extrato de solo da sombra na concentração de 100% mostraram semelhanças do 1º ao 11º dia de cultivo. Porém, a maior densidade celular final foi exibida no cultivo contendo extrato de solo mantido no sol na concentração de 50%.

**Figura 7-** Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D39Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.



**Figura 8-** Curva de crescimento por contagem celular da cepa D39Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.



As diferenças entre as contagens celulares e as medidas de fluorescência são inerentes aos métodos usados, visto que a fluorescência está associada à quantidade de clorofila presente. Percebe-se, pelos dois gráficos, que enquanto as culturas ainda mostram incremento de células (Figura 8) as medidas de fluorescência estão diminuindo, indicando redução na síntese de clorofila (Figura 7). Tais discrepâncias servem de alerta acerca do momento exato de interrupção dos cultivos para a colheita de biomassa na fase estacionária, quando o propósito é a detecção de produtos de interesse para a biotecnologia, sugerindo que frente a este fato um mesmo tipo de procedimento seja adotado para o acompanhamento dos cultivos para este propósito.

Na tabela 10 estão apresentados os parâmetros de crescimento para a cepa D39Z. Considerando-se os valores médios da constante de crescimento ( $k$ ), observa-se que o valor máximo foi apresentado para o cultivo desenvolvido com extrato de solo mantido na sombra na concentração de 50%, com 0,60 divisões/dia, e o valor mínimo de 0,35 divisões/dia foi registrado para o cultivo controle. Quanto ao rendimento celular o valor máximo (128553 células.mL<sup>-1</sup>) foi obtido para o cultivo controle e o menor para em extrato de solo de canavial mantido no sol na concentração de 50% (102840 células.mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 10-** Constante de crescimento  $k$  (divisões celulares/dia), rendimento celular (células.mL<sup>-1</sup>) da cepa D39Z cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.

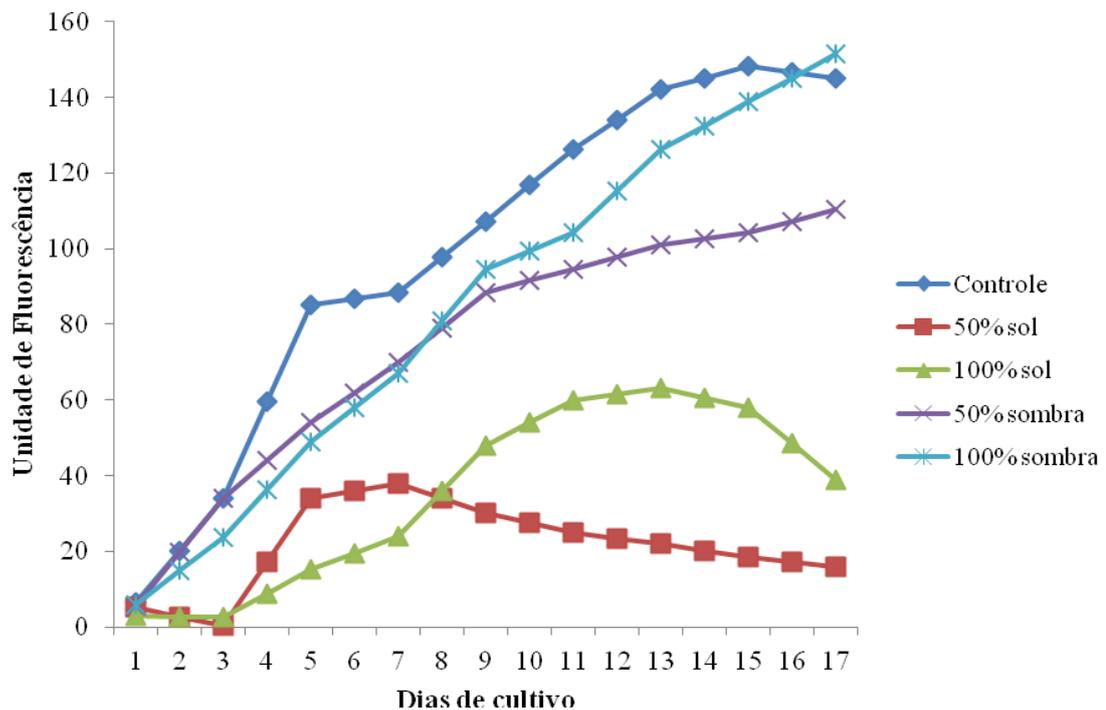
Código da cepa + meio de cultivo utilizado	$k$ (média e desvio padrão)	Rendimento celular (células.mL <sup>-1</sup> )
D39Z Zarrouk Controle	0,35±0,33	122601
D39Z 50% sol	0,50±0,33	128533
D39Z 100% sol	0,41±0,14	103005
D39Z 50% sombra	0,60±0,30	102840
D39Z100% sombra	0,48±0,44	109590

Os dados obtidos nos cultivos desta espécie são surpreendentes visto que indicam ausência de toxicidade da vinhaça nas concentrações usadas, sugerindo que para algumas espécies é possível a utilização deste resíduo para incrementar o crescimento de microalgas em cultivos usando meios alternativos. Ressalta-se, entretanto, o fato de que as duas espécies supra-referidas são cianobactérias e frente a divergência dos resultados entre ambas deduz-se que diferentes espécies respondem diferencialmente quanto a presença de vinhaça nos extratos de solo de canavial.

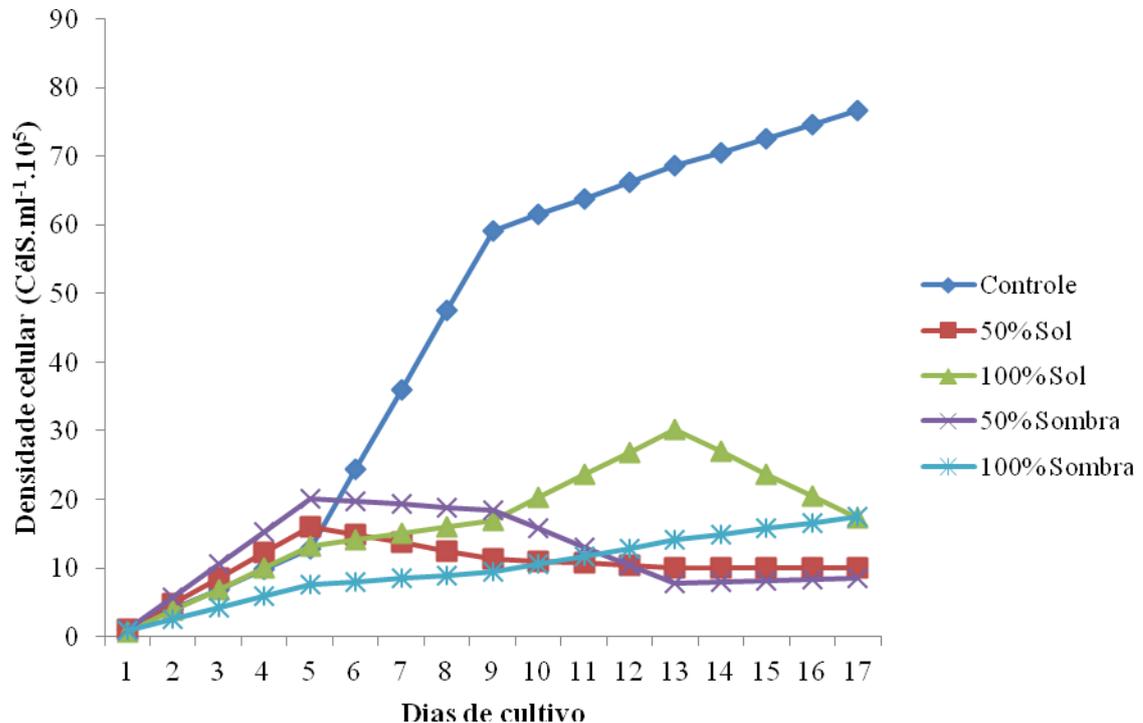
Nas figuras 9 e 10 estão apresentadas as curvas de crescimento para *Scenedesmus acuminatus* (D115WC) cultivada em meio sintético WC e com variações de concentração de

extrato de solo regado com vinhaça. A curva de fluorescência (Figura 9) mostra que o desenvolvimento dos cultivos nos extratos de solo de canavial mantidos na sombra e nas concentrações de 50% e 100% foram maiores que nos extratos de solo de canavial mantidos no sol, nas mesmas concentrações. O cultivo em extrato de solo da sombra a 100% apresentou o maior resultado final. Já a curva por densidade celular (Figura 10) mostrou que os cultivos nos frascos contendo as concentrações 50% de extrato de solo do sol e 100% de extrato de solo da sombra foram superiores ao controle até 5º dia, mas nenhuma das concentrações de sol ou sombra exibiu densidade superior ou similar ao controle a partir do 6º dia de cultivo.

**Figura 9-** Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D115WC cultivada em meio sintético WC e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.



**Figura 10-** Curva de crescimento por contagem celular da cepa D115WC cultivada em meio sintético Zarrouk e em meio preparado com extrato de solo do canavial mantido na sombra e no sol e regado com vinhaça, nas concentrações de 50% e 100%.



Na Tabela 11 estão apresentados os parâmetros de crescimento para a cepa D115WC. Considerando-se os valores médios da constante de crescimento ( $k$ ), observa-se que o valor máximo foi apresentado para o cultivo desenvolvido em extrato de solo de canavial mantido no sol na concentração de 100%, com 0,88 (divisões/dia) e o valor mínimo de 0,56 (divisões/dia) foi observado para o cultivo desenvolvido em meio controle. Quanto ao rendimento celular o valor máximo foi obtido para o cultivo controle ( $76,66 \times 10^5 \text{ cél.mL}^{-1}$ ) e o menor para o cultivo em extrato de solo do sol na concentração 50% ( $16,03 \times 10^5 \text{ cél.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 11-** Constante de crescimento  $k$  (divisões celulares/dia), rendimento celular ( $\text{cel.mL}^{-1} \cdot 10^5$ ) da cepa D115WC cultivada em meio sintético WC e em meio preparado com extrato de solo do canavial regado com vinhaça em diferentes concentrações.

Código da cepa e meio de cultivo utilizado	$k$ (média e desvio padrão)	Rendimento celular ( $\text{cel.mL}^{-1} \cdot 10^5$ )
D115WC Controle	$0,56 \pm 0,34$	76,66
D115WC 50% sol	$0,59 \pm 0,32$	16,03
D115WC 100% sol	$0,60 \pm 0,34$	30,25
D115WC 50% sombra	$0,81 \pm 0,77$	20,11
D115WC 100% sombra	$0,88 \pm 0,78$	17,48

A vinhaça é um efluente da indústria sucroalcooleira que apresenta coloração marrom-escura proporcionada pela presença da melanoidina, um composto fenólico de alto peso molecular e muito tóxico, razão pela qual o uso direto da vinhaça como meio de cultura para organismos fotoautotróficos é inviável. Dessa forma, a adição de vinhaça ao solo de canavial, uma prática comum efetuada entre os produtores de cana-de-açúcar no período da safra, além de enriquecer o solo pode propiciar uma degradação natural da vinhaça a ponto de permitir o seu uso para o preparo de meios alternativos para o cultivo de microalgas. Tal prática poderá minimizar o impacto ambiental gerado por este resíduo, obtendo-se, a partir dele, energia ou outros compostos de grande interesse biotecnológico.

Entretanto, ressalta-se que os resultados dos ensaios realizados não se mostraram promissores para todas as espécies testadas, sugerindo que mais pesquisas são necessárias. Como foi observado, a *Spirulina platensis* não conseguiu se desenvolver em extrato de solo contendo vinhaça enquanto que as espécies *Planktothrix isothrix* e *Scenedesmus acuminatus* desenvolveram-se medianamente tanto em extratos de solo mantidos no sol como em extratos de solo mantidos na sombra e regados com vinhaça. É provável que resultados diferentes, com parâmetros de crescimento mais eficazes poderão ser obtidos com as mesmas espécies se outras concentrações de extratos de solo com vinhaça forem usadas.

Por outro lado, não foram feitas análises da composição nutricional dos meios preparados com extrato de solo, de maneira que pode haver tanto nutrientes em excesso como em falta nesse tipo de meio, sugerindo que a ausência de crescimento ou o baixo desenvolvimento dos cultivos não seja devido à toxicidade da vinhaça, mas aos níveis de nutrientes disponíveis para as microalgas testadas. Embora haja uma tendência em se considerar que o enriquecimento do meio de cultivo com nutrientes estimule o crescimento de todas as espécies tal presunção pode não ser verdadeira em sua totalidade pelo fato de que muitas espécies são sensíveis a concentrações altas de nutrientes dissolvidos, podendo até mesmo chegar à morte (LOURENÇO, 2006).

É certo que as alterações nas densidades celulares durante os cultivos são tanto consequências do meio de cultura utilizado como das condições físicas de cultivo e havendo condições ideais ou satisfatórias, todas as microalgas são propensas a se desenvolverem e atingirem altas densidades após a inoculação. Mas as respostas de crescimento são particularidades de cada espécie nas condições em que elas são cultivadas, o que determina que cada uma delas apresente diferentes velocidades de crescimento e consequentemente, diferentes níveis de produtividade.

Apesar de apresentar algumas variações em sua composição em geral a vinhaça é rica em nutrientes minerais como potássio, cálcio e enxofre além de apresentar elevado teor de matéria orgânica, com elevada demanda química de oxigênio (DQO) e pH ácido (PATHADE, 1999; ZAYAS et al., 2007). Devido a essas características, e por apresentar um custo relativamente baixo, a vinhaça vem sendo amplamente utilizada na fertirrigação de áreas cultivadas com cana (LUDOVICE, 1997). No entanto, ela pode contaminar águas subterrâneas e mananciais superficiais, devido à percolação ou lixiviação de altas concentrações de manganês, ferro, potássio, alumínio, cloreto, matéria orgânica, dentre outros (HASSUDA et al., 1990).

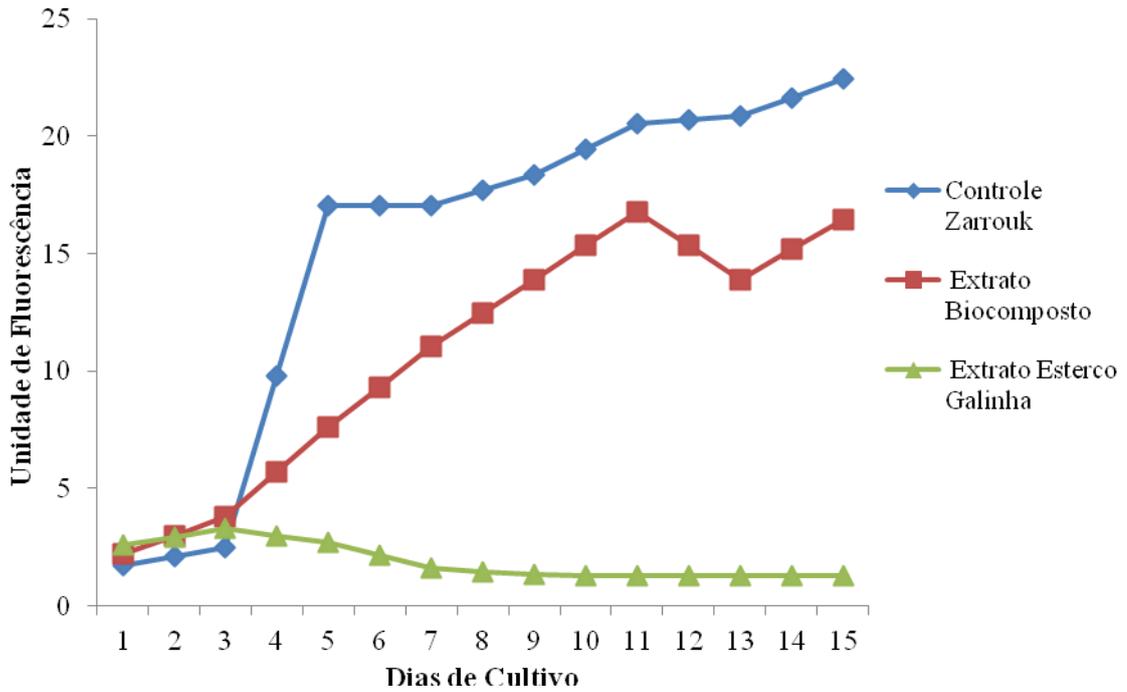
A literatura tem reportado alguns poucos trabalhos voltados para o cultivo de microalgas utilizando vinhaça da cana-de-açúcar como fonte de carbono, em cultivo heterotrófico (OLIVEIRA; CÁCERES, 1986; OLIVEIRA, 1988; BASTOS et al., 2009; BONINI, 2012). Uma análise econômica da produção de microalgas em cultivo heterotrófico torna-o caro em virtude do elevado custo dos biorreatores (TABERNERO et al., 2012).

Estão reportados também trabalhos voltados para redução ou remoção da melanoidina através de tratamentos anaeróbicos, aeróbicos e físico-químicos, visando à mitigação dos impactos ambientais que o despejo deste efluente ocasiona (VALDERRAMA et al., 2002; PANT; ADHOLEYA, 2007; TONDEE; SIRIANUNTAPIBOON, 2008; SATYAWALI; BALAKRISNAN, 2007; MOHANA et al., 2009; PRASAD; SRIVASTAVA, 2009; THAKUR et al., 2009; SZYMANSKI et al., 2010).

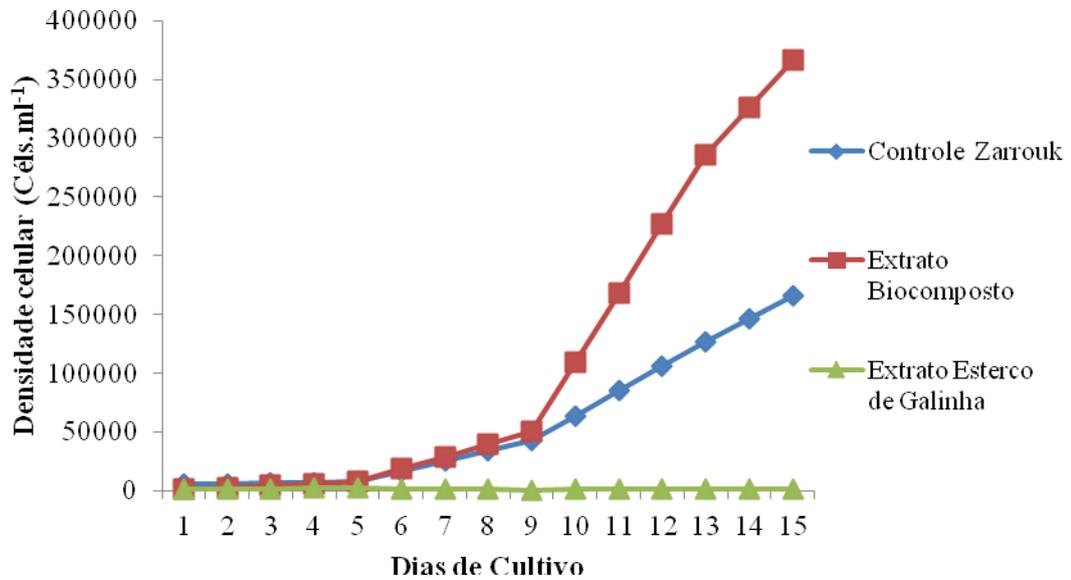
### **5.2.2 Cultivo de microalgas em extrato de biocomposto e de esterco de galinha**

A figura 11 apresenta a curva de crescimento por unidade de fluorescência para *S. platensis* (D9Z) em meio sintético Zarrouk e em extrato de biocomposto e de esterco de galinha. A curva mostra que os cultivos em extratos de biocomposto não foram superiores ao cultivo controle, mas o cultivo em extrato de biocomposto foi superior ao cultivo em extrato de esterco de galinha, que logo declinou a partir do 3º dia de cultivo. Já a curva por densidade celular (Figura 12) mostra um crescimento superior do cultivo em extrato de biocomposto a partir do 9º dia de cultivo, e o cultivo em extrato de esterco de galinha não se desenvolveu, tal resultado pode ser constatado com o padrão de coloração do cultivo, que não foi alterado (Figura 13-C).

**Figura 11-** Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D9Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.



**Figura 12-** Curva de crescimento por contagem celular da cepa D9Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.



**Figura 13-** Cultivo de *Spirulina platensis* (cepa D9Z) em meio Zarrouk (A), em extrato de biocomposto (B) e em extrato de esterco de galinha (C).



Na tabela 12 estão apresentados os parâmetros de crescimento para a cepa D9Z, obtidos a partir de contagens celulares ao longo da curva de crescimento. Considerando-se os valores médios da constante de crescimento ( $k$ ), observa-se que o valor máximo foi apresentado pelo cultivo em extrato de biocomposto de 0,75 (divisões/dia) e o valor mínimo de 0,58 (divisões/dia) foi observado no cultivo controle (Meio Zarrouk). Quanto ao rendimento em biomassa (g/L) o maior valor foi obtido para o cultivo em extrato de biocomposto (0,25g/L) e o menor para o cultivo controle (0,13 g/L). O rendimento celular foi maior para o cultivo em extrato de biocomposto ( $366751 \text{ células.mL}^{-1}$ ).

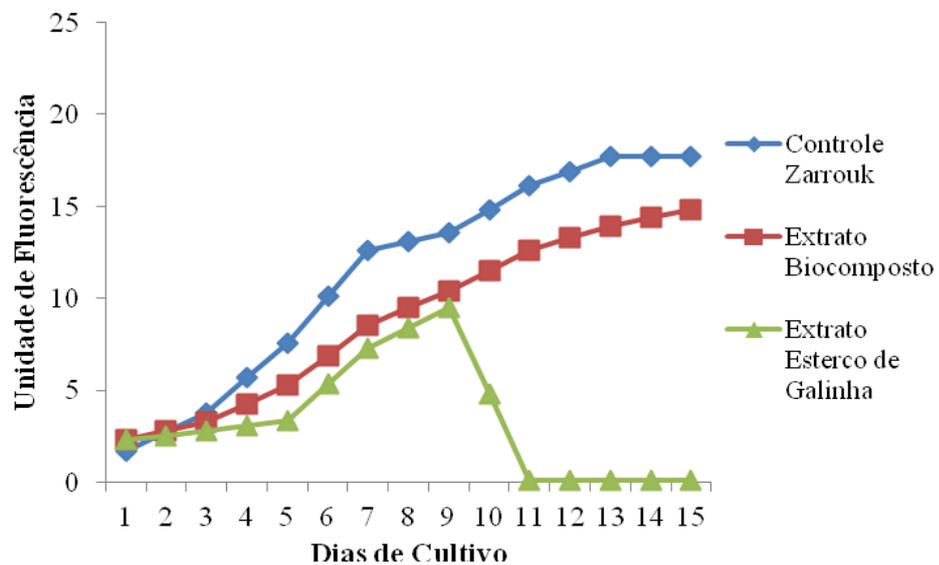
**Tabela 12** - Constante de crescimento  $k$  (divisões celulares/dia), rendimento em biomassa (g/L) e rendimento celular ( $\text{células.mL}^{-1}$ ) da cepa D9Z em meio sintético Zarrouk (controle) e meio de extrato de biocomposto (EB) .

Código da cepa e meio de cultivo utilizado	$k$ (média e desvio padrão)	Biomassa (g/L)	Rendimento celular ( $\text{células.mL}^{-1}$ )
D9Z Controle Zarrouk	$0,58 \pm 0,48$	0,13	165432
D9Z EB	$0,75 \pm 0,47$	0,25	366751

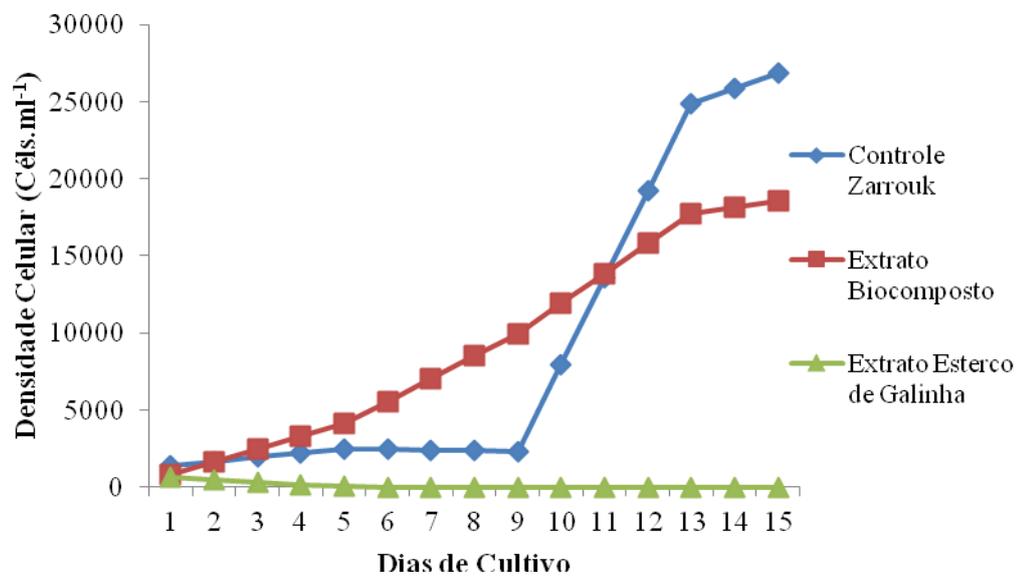
As Figura 14 apresenta as curva de crescimento por unidade de fluorescência para *Planktothrix isothrix* (D39Z) em meio sintético Zarrouk e em extrato de biocomposto e de esterco de galinha. A curva mostra que os cultivos em extrato de biocomposto não foram superiores ao cultivo controle, no entanto o cultivo em extrato de biocomposto foi superior ao

cultivo em extrato de esterco de galinha que logo declinou no 9º dia de cultivo. Já a curva de crescimento por densidade celular (Figura 15), apresentou crescimento acentuado no cultivo em meio Zarrouk (controle) a partir do 9º dia de cultivo.

**Figura 14-** Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D39Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.



**Figura 15-** Curva de crescimento por contagem celular da cepa D39Z em meio sintético Zarrouk e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.

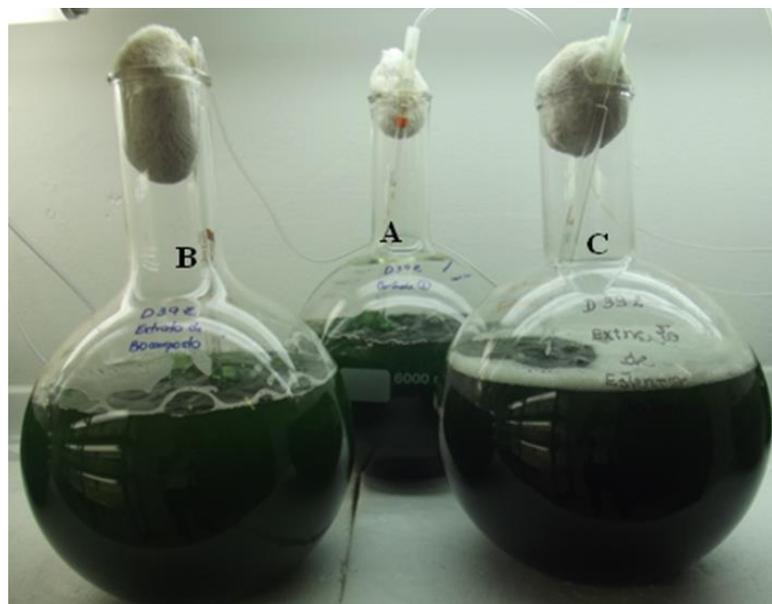


Na Tabela 13 estão apresentados dados de crescimento para a cepa D39Z, obtidos a partir de contagens celulares ao longo da curva de crescimento. Considerando-se os valores médios da constante de crescimento ( $k$ ), observa-se que o valor máximo foi apresentado pelo cultivo em meio sintético (controle) de 0,76 (divisões/dia) e o valor mínimo de 0,33 (divisões/dia) para os demais cultivos. Quanto ao rendimento em biomassa (g/L) o maior valor foi obtido para o cultivo em meio sintético (0,63g/L) e o menor para o cultivo em meio de extrato de esterco de galinha (0,15 mg/L), da mesma forma foi apresentado pelo rendimento celular com valor maior para o cultivo em meio sintético (26857 células.mL<sup>-1</sup>) e menor para o cultivo em extrato de esterco de galinha (30 células.mL<sup>-1</sup>). Fica evidente que o meio com extrato de biocomposto é mais eficaz que o meio com extrato de esterco de galinha. Padrões de coloração do cultivo podem ser observados na Figura 16.

**Tabela 13-** Constante de crescimento  $k$  (divisões celulares/dia), rendimento em biomassa (g/L) e rendimento celular (células.mL<sup>-1</sup>) das cepa D39Z em meios sintéticos Zarrowk (controle) e meios de extratos de biocomposto (EB) e esterco de galinha (EEG).

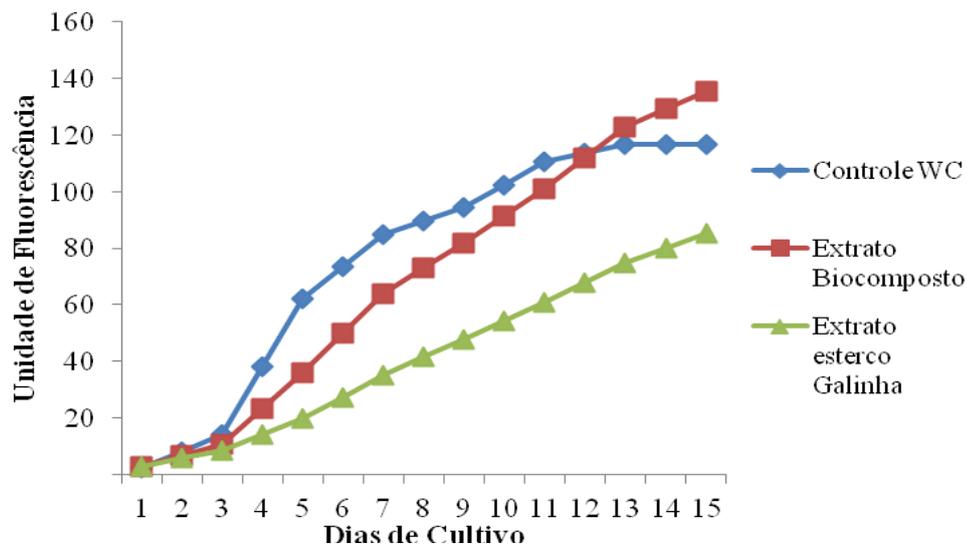
Código da cepa e meio de cultivo utilizado	K (média e desvio padrão)	Biomassa (g/L)	Rendimento celular (células.mL <sup>-1</sup> )
D39Z Controle Zarrowk	0,76±0,35	0,63	26857
D39Z EB	0,33±0,12	0,26	18567
D39Z EEG	0,33±0,16	0,15	30

**Figura 16-** Cultivo de *Planktothrix isothrix* (cepa D39Z) em meio Zarrowk (A), em extrato de biocomposto (B) e em extrato de esterco de galinha (C).

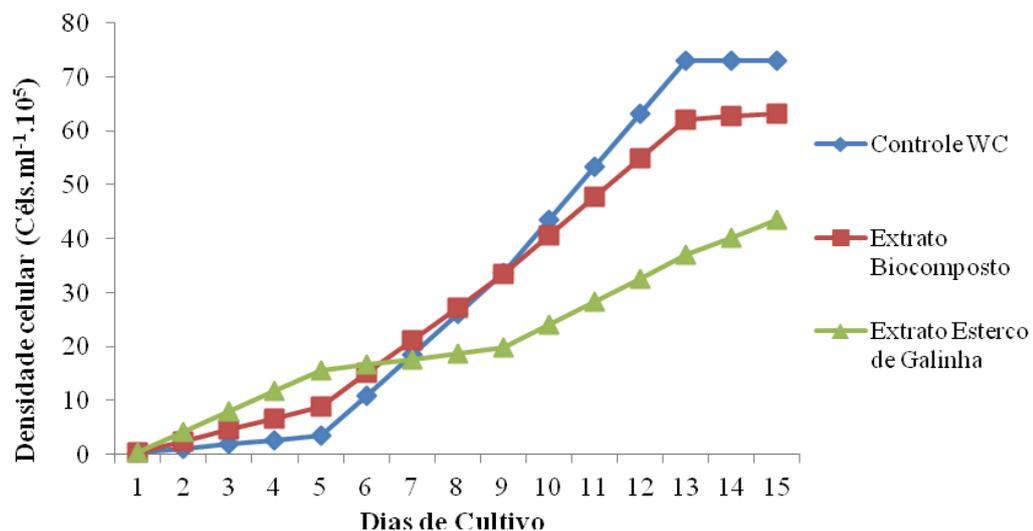


A Figura 17 apresenta a curva de crescimento por unidade de fluorescência para *Scenedemus acuminatus* (D115WC) em meio sintético WC e em extrato de biocomposto e de esterco de galinha. Observa-se que o cultivo em extrato de biocomposto foi um pouco superior ao cultivo controle e em extrato de esterco de galinha também houve um crescimento satisfatório dessa espécie, o mesmo comportamento nos extratos de biocomposto e esterco de galinha pode ser observado na curva de crescimento por densidade celular (Figura 18). Padrões de coloração do cultivo podem ser observados na Figura 19.

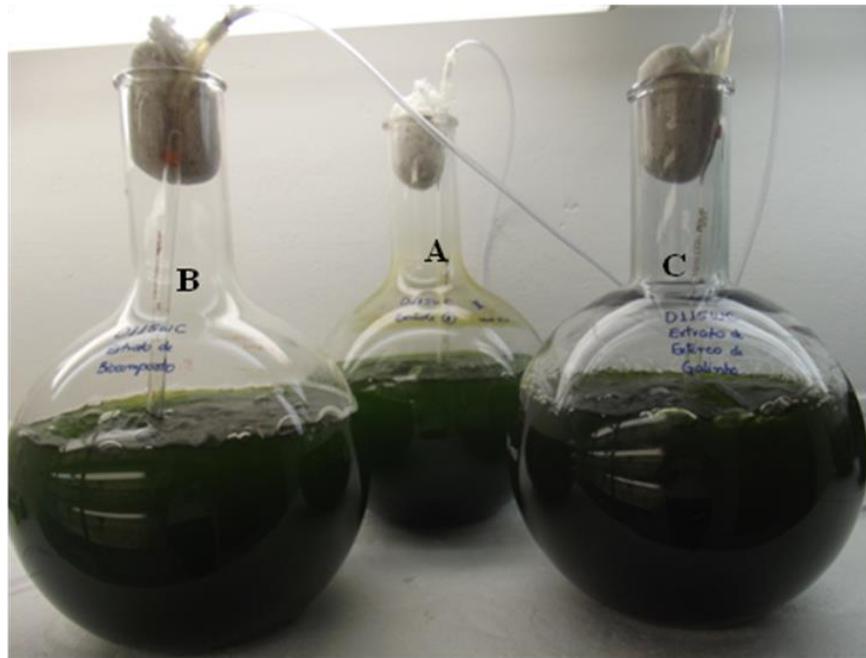
**Figura 17-** Curva de crescimento por unidade de fluorescência da cepa D115WC em meio sintético WC e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.



**Figura 18-** Curva de crescimento por contagem celular da cepa D115WC em meio sintético WC e meios de extratos de biocomposto e esterco de galinha.



**Figura 19-** Experimento da cepa D115WC - A = em meio Zarrouk; B = extrato de biocomposto; C = extrato de esterco de galinha.



Na Tabela 14 estão apresentados dados de crescimento para a cepa D115WC, obtidos a partir de contagens celulares ao longo da curva de crescimento. Considerando-se os valores médios da constante de crescimento ( $k$ ), observa-se que o valor máximo foi apresentado pelo cultivo em meio de extrato de biocomposto e extrato de esterco de galinha de 0,63 (divisões/dia) e o valor mínimo para o cultivo em meio controle de 0,50 (divisões/dia) foi para o cultivo em meio de extrato de esterco de galinha. Quanto ao rendimento em biomassa (mg/L) o maior valor foi obtido para o cultivo em meio sintético (0,37 mg/L) e o menor para o cultivo em meio de extrato de esterco de galinha (0,15 mg/L). Quanto ao rendimento celular, o maior valor foi obtido também pelo cultivo em meio sintético (controle) de ( $73 \text{ células.mL}^{-1} \cdot 10^5$ ) e o menor para o cultivo em extrato de esterco de galinha ( $44 \text{ células.mL}^{-1} \cdot 10^5$ ). E também para esta espécie o cultivo em extrato de biocomposto, em termos de biomassa é mais eficaz que o extrato de esterco de galinha. Estes dados estão correlacionados com os dados da curva de crescimento por densidade celular.

**Tabela 14-** Constante de crescimento  $k$  (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L) e rendimento celular ( $\text{cel.mL}^{-1} \cdot 10^5$ ) da cepa D115WC em meio sintéticos WC (controle) e meios de extratos de biocomposto (EB) e esterco de galinha (EEG).

Código da cepa e meio de cultivo utilizado	$k$ (média e desvio padrão)	Biomassa (g/L)	Rendimento celular ( $\text{cel.mL}^{-1} \cdot 10^5$ )
D115WC Controle WC	$0,50 \pm 0,27$	0,37	73
D115WC EB	$0,63 \pm 0,30$	0,21	63
D115WC EEG	$0,63 \pm 0,37$	0,15	44

Dos cultivos realizados em meio de extrato de biocomposto e esterco de galinha, os resultados foram positivos para o extrato de biocomposto. A cepa D9Z, apesar de não ter crescido no extrato de esterco de galinha, cresceu mais que o controle no extrato de biocomposto. No extrato de esterco de galinha a espécie que cresceu medianamente bem foi a D115WC. Estes dados sugerem a necessidade de realização de novos experimentos aumentando a concentração do extrato de biocomposto, bem como analisar o extrato de esterco de galinha procurando determinar as possíveis causas que inibiram o crescimento das microalgas com o propósito de obter um rendimento positivo e assim baratear os custos da produção. É possível que o baixo rendimento dos cultivos em extrato de esterco de galinha estejam associados à relação N:P desses extratos.

A biotecnologia das algas é reconhecida mundialmente como fonte de diferentes produtos de suma importância, mas nesse contexto, particularmente as microalgas constituem uma boa opção para o aporte de proteínas, vitaminas e minerais. Contudo, esta é uma tecnologia muito cara e nesse sentido, a evolução das pesquisas com relação à procura por meios de cultivo eficazes e mais baratos tornam-se necessários para minimizar custos de produção (CABRALES; GONZALEZ, 2004; SHEEHAN et al., 1998; PEREIRA et al., 2012) com aumento de produtividade em biomassa.

Visando melhorias no custo-benefício da produção industrial, microalgas estão sendo cultivadas em condições alternativas, procurando-se, inclusive, incorporar resíduos da atividade industrial na formulação desses meios, como se efetuou nesta pesquisa. Tal abordagem pode representar uma das mais sustentáveis para esse setor (RAWAT et al, 2011;. PARK et al., 2011;. CHAN et al., 2011; RAS et al., 2011), visto que o custo do tratamento de muitos resíduos é contrabalançado com a produção de biomassa, que pode gerar energia e produtos valiosos, e que, por sua vez, também pode causar um impacto econômico significativo na sociedade (RAWAT et al, 2011;. MIZSEY; RACZ, 2010).

Contudo, o uso de efluentes industriais para tal finalidade ainda encontra inúmeras limitações, principalmente devido ao custo para manter as condições autotróficas, além da turbidez característica das águas residuais agroindustriais que não permitem a penetração da luz de forma homogênea no sistema de cultivo (HEREDIA-ARROYO et al., 2011; BONINI; BASTOS, 2012). Além disso, as composições dos efluentes variam de acordo com sua origem, sendo que muitos deles podem conter grande quantidade de matéria orgânica, ou

ainda apresentar altas concentrações de metais tóxicos (BARROCAL et al., 2010; DAL MAGRO et al., 2011).

Vários estudos foram realizados para reduzir o custo total de produção de microalgas, dentre alguns meios testados nas duas últimas décadas estão: resíduos líquidos de indústria de suco de laranja utilizado no cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) (BELTRÃO, 1992); NPK (20:5:20) para cultivo de *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus bijugatus* e *Ankistrodesmus gracilis* (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 1993); água de matadouro, vinhoto e caldo de peixe para o cultivo de *Tetraselmis chuii* (KLEIN; GONZALES, 1993); vinhaça de cana de açúcar para o cultivo de *Chlorella* sp. (OLIVEIRA, 1995); urina humana para cultivo de *Scenedesmus acuminatus* (ADAMSSON, 2000); água intersticial extraída dos sedimentos de tanques de criação de camarão para o cultivo de *Chaetoceros calcitrans*, *Nannochloropsis oculata* e *Oscillatoria* sp. (YUSOFF et al., 2001); efluente sintético de suíno para o cultivo de *Spirulina platensis* (BERTOLIN et al., 2005); meio enriquecido com substâncias inorgânicas como nitrato, fosfato, traços de minerais e vitaminas para o cultivo de *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana* (SEBASTIEN; KLEIN, 2006); meio a base de esterco suíno, “*in natura*” e biodigerido para crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* (FIORESI, 2007); diferentes concentrações de esgoto urbano secundário (10%, 20%, 30% e 40%) para o crescimento de *Tetraselmis chuii* e *Dunaliella viridis* (COSTA et al., 2004); e efluente da bovinocultura biodigerido como substituto do meio de cultivo sintético *Chu* para produção de *Scenedesmus* sp. (OLIVEIRA, 2013).

A utilização dos efluentes como meio de cultura deverá reduzir a necessidade de água fresca e de nutrientes e no final do processo um efluente limpo pode ser conseguido para descarga em cursos de água com parâmetros abaixo dos limites recomendados, um processo que se mostra economicamente viável e favorável ao meio ambiente. Mas tais investigações devem ser focadas na otimização das culturas de microalgas avaliando o seu crescimento em uma ampla gama de condições (PIRES et al., 2013).

Vários autores têm estudado a integração das águas residuais no tratamento e captura de CO<sub>2</sub> para geração de energia (PARK; CRAGGS, 2011; CRAGGS et al., 2011. PARK et al., 2011; PITTMAN et al., 2011). Hoje, a humanidade consome mais recursos naturais e serviços ecológicos do que o planeta poderia oferecer, de maneira que a adoção de medidas de sequestro de carbono e uso de energias renováveis (GOLDEMBERG, 2008), em harmonia com as necessidades humanas e a capacidade de suporte dos ecossistemas são bem vindas e mostram-se vitais para a sobrevivência futura do planeta.

Várias microalgas, marinhas e dulciaquícolas são adequadas para produção de biodiesel devido sua alta concentração de óleo, com aumentos consideráveis quando cultivadas com baixa concentração de nitrogênio (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Uma das maiores limitações para inserção desta matéria-prima para biodiesel consiste nas práticas utilizadas para o cultivo, uma vez que os custos para produção são maiores que os dispensados para os combustíveis fósseis (VAN BEILEN, 2010). Mas a produção de biocombustíveis aliada com a produção de alimento para animais, tratamento de águas residuais ou obtenção de coprodutos de maior valor tem sido proposta, como uma forma de superar estas limitações econômicas (BENEMANN, 2013; CABANELAS, 2013). Assim, levando em conta a disponibilidade, o rendimento, a não utilização de solos destinados à agricultura, as microalgas apresentam grande potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel (RAMOS et al., 2003; TEIXEIRA; MORALES, 2006; SUAREZ et al., 2009) e outros produtos de grande importância biotecnológica.

O cultivo de microalgas vinculado a um sistema de tratamento de efluente apresenta como principais vantagens diminuição do custo de produção de biomassa além da reciclagem de efluentes através da estabilização dos nutrientes presentes no meio; agregação de valor ao processo, produção de bioprodutos de interesse comercial, como por exemplo, pigmentos, ácidos graxos, fertilizantes, além de biocombustíveis como biohidrogênio, biogás e biodiesel (RODRIGUES E BELLI; 2004; CUARESMA et al., 2006).

### **5.3 Aceitabilidade de *Spirulina platensis* em populações de trabalhadores rurais do semiárido paraibano**

#### **5.3.1 Análise microbiológica da biomassa de *Spirulina platensis***

Em virtude da necessidade do controle sanitário, com vistas à qualidade microbiológica dos produtos alimentícios e a proteção da saúde da população, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, descritos nas tabela 15. As análises microbiológicas da biomassa de *S. platensis* não apresentaram desenvolvimento dos microrganismos pesquisados, estando, portanto, dentro dos padrões aceitáveis para consumo humano, podendo assim ser adicionada a alimentos.

**Tabela 15-** Avaliações microbiológicas da biomassa de *S. platensis* e seu padrão microbiológico.

	Coliformes a 45°C/g (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp/25g (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g (UFC/g)	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> /g (UFC/g)
<b>Padrão</b>	10	Ausência	5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>2</sup>
<b>Microbiológico</b>				
<b>PM</b>	10	Ausência	5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>2</sup>

NMP/g = Número mais provável por grama; UFC/g = Unidades Formadoras de Colônias por grama referentes à RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). PM = Padrões Microbiológicos referentes à RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001)

### 5.3.2 Teste de aceitabilidade e intenção de compra

A *Spirulina* nas versões *in natura*, seca e em alimento (10% de biomassa) foi submetida à avaliação sensorial por 75 provadores (agricultores sindicalizados do município de Frei Martinho, PB), sendo 41, 3% do sexo masculino e 58,7% do sexo feminino, com idade entre 18 e 65 anos (Média=43,01).

A tabela 16 representa os valores médios dos escores atribuídos durante a avaliação da aceitabilidade da *Spirulina* nas suas versões *in natura*, seca e em alimento na proporção de 10%, podendo-se observar que a menor aceitação para odor na versão “*in natura*” da *S. platensis* foi mais forte (Média = 5,29) que as demais versões.

**Tabela 16-** Valores médios dos escores para os atributos avaliados no Teste de Aceitação da *S. platensis* em suas versões “*in natura*”, seca e em alimento (10% de biomassa).

Atributo	“ <i>In natura</i> ”	Seca	Alimentos 10% Sp
<b>Aparência</b>	7,56 <sup>b</sup>	8,08 <sup>a</sup>	8,21 <sup>a</sup>
<b>Odor</b>	5,29 <sup>c</sup>	7,47 <sup>b</sup>	8,16 <sup>a</sup>
<b>Textura</b>	6,59 <sup>b</sup>	8,15 <sup>a</sup>	8,12 <sup>a</sup>
<b>Av. Global</b>	7,25 <sup>b</sup>	8,08 <sup>a</sup>	8,27 <sup>a</sup>

Sp = *Spirulina platensis*, Av. Global= Avaliação Global  
 Nas linhas, letras iguais não diferem entre si, a 95% de confiança

Na Tabela 17 se acham representados os índices de aceitabilidade podendo-se evidenciar um elevado percentual para a *Spirulina platensis* em todas as suas versões, a exceção apenas do atributo odor em sua forma “*in natura*” (66,12%) que não atingiu o percentual mínimo satisfatório de aceitação (70%) proposto por Teixeira; Meinert e Barbeta (1987).

**Tabela 17-** Índice de aceitabilidade para a *S. platensis* em suas versões *natura*, seca e em alimento (10% de biomassa)

Atributos	" <i>In natura</i> "	Seca	Alimentos 10% de Sp.
<b>Aparência</b>	84,00%	89,77%	91,22%
<b>Odor</b>	66,12%	83,00%	90,66%
<b>Textura</b>	73,22%	90,55%	90,22%
<b>Avaliação Global</b>	80,55%	91,22%	91,88%

Sp = *Spirulina platensis*

Outros trabalhos realizados com adição de *S. platensis* em alimentos também apresentaram uma boa aceitabilidade: Barros (2010) obteve um índice de aceitação de 80,27% para macarrão enriquecido com 10% de biomassa de *S. platensis*; Moreira et al. (2013) obtiveram um índice de aceitação de 71% para gel energético desenvolvido com com 0,35 % de *Spirulina* e Navacchi et al. (2012) usando a escala hedônica facial, mas com percentual mínimo também de 70%, obtiveram 98,8% de aceitabilidade para bolo enriquecido com *S. platensis* e farelo de fecularias.

Na Tabela 18 encontram-se os percentuais de aceitação, indiferença e rejeição para a *S. platensis* em sua versão "*in natura*". Houve diferença significativa entre os percentuais de aceitação e indiferença para os atributos aparência, textura e avaliação global. E entre os percentuais de aceitação, indiferença e rejeição para o atributo odor. De todos os atributos, o odor foi o único que não apresentou percentual de aceitação elevado com (20,00%). Este fato pode ser explicado mediante as condições em que o material "*in natura*" foi exposto, embora transportado e conservado em condições herméticas e sob refrigeração, as suas características naturais foram alteradas, já que "*in natura*" a *S. platensis* não apresenta odor forte, mas ainda assim considerando o percentual de avaliação global é possível afirmar que houve uma boa aceitação para *S. platensis* na versão "*in natura*".

**Tabela 18-** Percentual de aceitação, indiferença e rejeição de *S. platensis* na versão "*in natura*".

Atributos	Percentual da versão " <i>In natura</i> "			Teste de Mann-Whitney		Teste Kruskal-Wallis	
	Aceitação	Indiferença	Rejeição	Z	p<	H	p <
<b>Aparência</b>	90,67 <sup>a</sup>	6,67 <sup>b</sup>	1,33	3,712652	0,01	--	--
<b>Odor</b>	20,00 <sup>a</sup>	74,67 <sup>b</sup>	5,33 <sup>c</sup>	--	--	30,84796	0,01
<b>Textura</b>	80,00 <sup>a</sup>	18,67 <sup>b</sup>	1,33	5,796551	0,01	--	--
<b>Av. Global</b>	94,67 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	0,00	3,348212	0,01	--	--

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas. Valores que não possuem letras, não foram analisados estatisticamente, por representarem uma única resposta (Av. Global=Avaliação Global).

A Tabela 19 apresenta os percentuais de aceitação, indiferença e rejeição para a *S. platensis* em sua versão seca. Houve diferença significativa entre os percentuais de aceitação e rejeição para aparência e odor. Mas de maneira geral os percentuais apresentados pela aparência (97,33%), odor (93,33%), textura (98,67%) e avaliação global (100%) foram elevados, indicando que houve uma forte aceitação para a *S. platensis* nesta versão.

**Tabela 19-** Percentual de aceitação, indiferença e rejeição da *S. platensis* na versão seca.

Atributos	Percentual da versão seca			Teste de Mann-Whitney	
	Aceitação	Indiferença	Rejeição	Z	P<
<b>Aparência</b>	97,33 <sup>a</sup>	0,00	2,67 <sup>b</sup>	2,400658	0,016
<b>Odor</b>	93,33 <sup>a</sup>	1,33	5,33 <sup>b</sup>	2,398630	0,016
<b>Textura</b>	98,67	1,33	0,00	*	*
<b>Av. Global</b>	100,00	0,00	0,00	*	*

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas. Valores que não possuem letras, não foram analisados estatisticamente, por representarem uma única resposta ou não ocorreu resposta (\* = estatística não realizada; Av. Global= Avaliação Global).

Na tabela 20 estão apresentados os percentuais de aceitação, indiferença e rejeição para a *S. platensis* na versão alimento enriquecido com *S. platensis* (10%). Houve diferença significativa entre os percentuais de aceitação e indiferença para odor e textura. Mas, de maneira geral todos os atributos apresentaram percentuais elevados de aceitação: aparência com 98,67%, odor com 97,33%, textura com 97,33% e avaliação global com 98,68%.

**Tabela 20-** Percentual de aceitação, indiferença e rejeição da *S. platensis* na versão em alimentos (10% de biomassa).

Atributos	Percentual na versão em alimentos			Teste de Mann-Whitney	
	Aceitação	Indiferença	Rejeição	Z	P<
<b>Aparência</b>	98,67	1,33	0,00	*	*
<b>Odor</b>	97,33 <sup>a</sup>	2,67 <sup>b</sup>	0,00	2,400658	0,016
<b>Textura</b>	97,33 <sup>a</sup>	2,67 <sup>b</sup>	0,00	2,400658	0,016
<b>Av. Global</b>	98,67	1,33	0,00	*	*

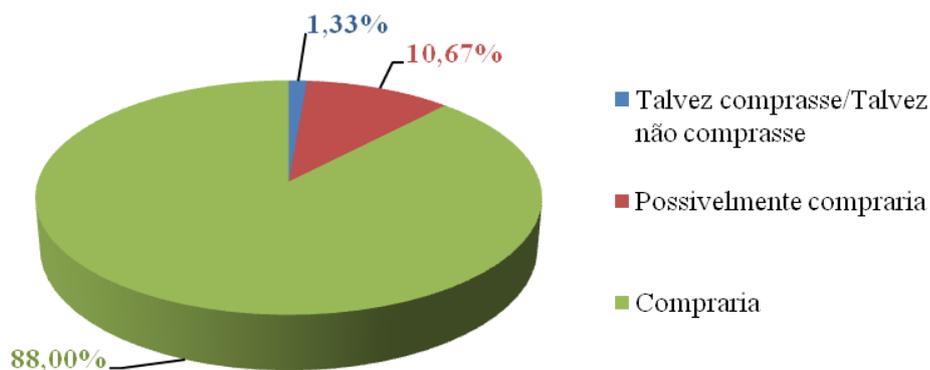
Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas. Valores que não possuem letras, não foram analisados estatisticamente, por representarem uma única resposta ou não ocorreu resposta para o atributo. (\*= estatística não realizada; Av. Global= Avaliação Global).

Das três versões os maiores percentuais foram registrados para aceitação e os menores para rejeição. Considerando a avaliação global o maior percentual foi apresentado pela versão seca (100%).

Na Figura 20 observamos a intenção de compra para a *Spirulina* nas versões seca e adicionada a alimento. A maioria dos produtores (88%) afirmou que “compraria”, 10,67% que “possivelmente compraria” e 1,33% que “talvez comprasse/talvez não comprasse”. Nenhum deles afirmou que “jamais compraria” ou “possivelmente não compraria”. Moraes et al.(2006) desenvolveram biscoitos com adição de 1,0%, 3,0% e 5,0% de biomassa de *S. platensis* e obtiveram 58%, 50% e 40% respectivamente para intenção de compra.

Os percentuais para alimentos enriquecidos com *Spirulina* (bolos, sucos, sorvetes, biscoitos) demonstraram alto grau de aceitabilidade. Isso sugere que se ações técnico-educacionais forem desenvolvidas com essas pessoas talvez seja possível, em médio prazo, obter-se sucesso quanto à aceitabilidade da biomassa fresca, pois segundo El-Dash e Germani (1994), o consumidor passa a aceitar um novo produto desde que este possa fazer parte de seus hábitos alimentares, sejam gostosos, de qualidade e com preço acessível, competindo assim, com o produto convencional.

**Figura 20-** Intenção de compra para *Spirulina* seca em alimento enriquecido com 10% de sua biomassa.



A alimentação básica do sertanejo nordestino consiste de proteína animal (bovina e caprina) em sua maior parte, suplementada por feijão, fava, milho e arroz. Mesmo assim, na região existe déficit proteico estacional (associado ao regime climático), o que torna favorável a inclusão de *Spirulina* na dieta local.

Como se trata de um cultivo ecológico, não causa poluição, erosão do solo, contaminação da água ou a destruição de florestas, fatores estes que não estão internalizados nos custos de produção dos alimentos convencionais. Outra vantagem para se disseminar o cultivo de *Spirulina* entre agricultores da região semiárida brasileira é que não se requer solo

fértil, não são necessários grandes espaços, não há desperdício de água, pois ela pode ser reutilizada, o que é extremamente favorável em áreas áridas, e o consumo de energia é baixo.

Para retificar o positivo índice de aceitabilidade pelos produtores rurais, se faz necessário saber como eles se posicionam frente à *Spirulina*. De forma inovadora (estão abertos a novas práticas) ou conservadora (preferem manter as práticas tradicionais)? Questões como essas, justificam a análise das atitudes frente à *Spirulina*.

### 5.3.3 Teste de atitudes frente à *Spirulina*

A verificação das atitudes frente à *Spirulina* foi realizada por meio de uma versão adaptada da Escala de Atitudes Ecocêntrica e Antropocêntrica (Thompson e Barton, 1994). Essa versão adaptada foi composta de 15 itens, distribuídos em dois fatores, a saber: Atitudes Inovadoras e Atitudes Conservadoras (APÊNDICE B). A viabilidade dessa versão adaptada foi verificada por meio de critério como a fatorialidade dos dados ( $KMO = 0,554$ ; Teste de Esfericidade de Bartlett:  $X^2 = 364,913$ ;  $p < 0,001$ ), considerando a possibilidade de uma análise fatorial dos Componentes Principais.

O número de fatores extraídos foi fixado em dois fatores, que apresentaram *Eigenvalue* superiores a 2,26 e 3,35 e explicaram conjuntamente 37,47% da variância total, salientando-se que o fator I (aberto a mudanças = atitude inovadora) explica mais da metade da variância total com 22,39%. Estabeleceu-se como critério de saturação aceitável o valor mínimo de 0,30, desta forma, foram encontrados 12 itens, onde seis (15, 13, 14, 4, 8 e 9) são correspondentes ao fator aberto a mudanças e seis (7, 5, 1, 6, 10, 2) ao fator refratário a mudanças, já o item 3, 11 e 12 foram excluídos por apresentarem carga fatorial inferior a 0,50.

Para verificar o índice de consistência interna utilizou-se o coeficiente *Alpha de Cronbach*, sendo definido para o fator I  $\alpha = 0,63$  e para o fator II  $\alpha = 0,65$ .

Todos os dados estão demonstrados na tabela 21. Embora que o tratamento estatístico tenha revelado valores um pouco abaixo do que se espera para a escala, há que se considerar como ponto positivo que mesmo como baixo número de índice, e para escala adaptada os itens se mostraram consistentes.

**Tabela 21-** Estrutura fatorial da Escala de Atitudes relacionadas com abertura a mudanças (atitude inovadora) e refratário a mudanças (atitude conservadora).

Descrição dos itens	Fatores		$h^2$
	FI	FII	
15. Uma das razões importantes para incorporar <i>Spirulina</i> na alimentação diária é assegurar uma melhor qualidade de vida	0,90		0,83
13. Certamente a <i>Spirulina</i> pode ser útil para alimentação humana e de animais e para outras finalidades, e assim seu cultivo deve ser estimulado entre os sertanejos.	0,77		0,62
14. Uma das razões mais importantes pelas quais devemos cultivar <i>Spirulina</i> é porque ela também pode ajudar a melhorar a renda do pequeno agricultor.	0,70*		0,50
4. Gostaria de ver mais espaços da caatinga sendo ocupados com criação de bois ou bodes e outras atividades agrícolas	0,66*		0,46
8. Tudo que se diz sobre as dificuldades do sertanejo é exagerado	0,65*		0,46
9. Angustia-me ver que poderá faltar alimento para a humanidade e que a miséria poderá se amplificar, mas não acho que isso tem a ver com as dificuldades que passamos no sertão. (r)	-0,34		0,13
7. Eu não me preocupo com problemas da natureza pois com o tempo a maioria dos problemas ambientais se resolverão por si mesmos.		0,75	0,59
5. O governo deveria investir mais no nordeste para fomentar essas coisas que já são tradição. Não precisamos do novo. A caatinga dá de tudo.		0,72	0,57
1. Necessitamos conservar as nossas tradições de sertanejo para assegurar uma vida de alta qualidade.		0,56*	0,36
6. Eu não acho que o problema o desmatamento da caatinga é tão grave como o povo fala.		0,56*	0,40
10. A utilização intensiva de água em irrigação agrícola, como é comum em muitas propriedades rurais é fato que não me preocupa, pois sempre é possível conviver com a seca.		0,54*	0,30
2. Alimento saudável é aquele que podemos comprar todos os dias. Ter dinheiro faz a diferença, pois dinheiro e comida geram bem estar.		0,51*	0,26
<b>Eigenvalue</b>	3,35	2,26	-
<b>Variância %</b>	22,39	15,08	-
<b>Variância Acumulada %</b>	22,39	37,47	-
<b>Alpha de Cronbach</b>	0,63	0,65	-

Nota: FI e FII definem as cargas fatoriais para a análise de Componentes Principais, com rotação *Varimax*; FI= aberto a mudanças e FII= refratário a mudanças; \*=saturação considerada aceitável;  $h^2$  = Comunalidades; (r) Item inverso.

No entanto, excluindo-se o item 9 (Angustia-me ver que poderá faltar alimento para a humanidade e que a miséria poderá se amplificar, mas não acho que isso tem a ver com as dificuldades que passamos no sertão) do Fator I tem-se uma consistência um pouco melhor com  $\alpha = 0,67$ , valores estes, medianamente satisfatórios.

Como pode se observar na tabela 22, os maiores percentuais obtidos para atitude inovadora são referentes ao escore 1 “*concordo totalmente*” e 2 “*concordo parcialmente*” e para atitude conservadora foram para os escores 3 “*discordo parcialmente*” e 4 “*discordo*”

*totalmente*”. Isto sugere uma forte abertura a inovações, porém o tradicionalismo ainda persiste.

**Tabela 22**– Frequência (%) dos escores obtidos no teste para atitude inovadora e conservadora

Item	Escore				
	1	2	3	4	5
<b>Atitude Inovadora</b>					
Item 15	78,7	21,3	---	---	---
Item 13	68,7	32,0	---	---	---
Item 14	68,0	30,7	---	1,3	---
Item 4	42,7	26,7	---	9,3	21,3
Item 8	36,0	25,3	6,7	20,0	12,0
Item 9	9,3	54,7	4,0	28,0	4,0
<b>Atitude Conservadora</b>					
Item 7	2,7	2,7	---	9,3	85,3
Item 5	2,7	30,7	---	64,0	2,7
Item 1	46,7	40,0	---	4,0	9,3
Item 6	2,7	6,7	1,3	5,3	84,0
Item 10	---	---	---	8,0	92,0
Item 2	18,7	8,0	---	58,7	14,7

Destaques em **vermelho** = maior percentual por escore

Os resultados do teste de aceitabilidade de *Spirulina* e de atitude com os trabalhadores da zona rural do semiárido nordestino evidenciaram juntos forte atitude inovadora; ainda que com resquícios de conservadorismo, podemos observar que existe uma abertura a mudanças em seus costumes alimentares. Isso pode favorecer a disseminação entre tais produtores de processos artesanais de cultivo, com o devido suporte técnico, através de ações político-institucionais. A biomassa excedente poderia ser usada como fertilizante na agricultura melhorando o solo e incrementando a produção de alimento (FAO, 1981; ZEENAT et al., 1990); como incremento da dieta de vários animais (VENKATARAMAN et al., 1994; EL-SAYED, 1994; BRITZ, 1996) e como suplemento alimentar na aquicultura (NAKAGAWA; GOMEZ-DIAZ, 1975; STOTT, et al., 2004; LU; TAKEUCHI, 2004; VONSHAK, 1997).

Um fator a ser considerado, e que possivelmente contribuiu para tal resultado, é a época em que os questionários foram aplicados, marcada por intensa exaustão de água e redução de produção até mesmo para subsistência na região, fatos estes que podem ter feito com que alguns produtores rurais pudessem repensar as suas práticas de sobrevivência na seca.

Entretanto, não será fácil transformar formas tradicionais de produção na caatinga, mas o sucesso não é impossível se sistemas consorciados de cultivo forem implantados. Em Karla, Índia, o famoso Ashram de Mahatma Gandhi, foi estabelecido um projeto piloto de

produção doméstica que integra produção de compostagem, peixes e *Spirulina*; a compostagem e os peixes são vendidos para moradores locais, e a *Spirulina* vai para Bombaim onde é distribuída na forma de biscoitos e macarrão para as crianças (PRASAD, 2005). Na África Ocidental, em Farendé, Togo, uma aldeia remota onde outrora existiam florestas exuberantes, elefantes e tigres, foram instalados painéis solares para carregar baterias de caminhão que movimentam as pás nos tanques de cultivo. A biomassa produzida é seca em aquecedor solar e é distribuída para crianças em clínicas de saúde (HENRIKSON, 2009).

Apesar de ser novidade para o sertanejo da caatinga, a *Spirulina* já é consumida em mais de 40 países de diversas maneiras (CIFERRI, 1983; BELAY, 1993; HENRIKSON, 2010; KORU, 2012), e até mesmo em produtos de higiene como cremes para a pele e xampus e como suplementos para peixes, animais aquáticos, pássaros, cães e gatos (HENKISON, 2010). A *Spirulina* é uma proteína completa, contendo todos os aminoácidos essenciais, embora com quantidades reduzidas de metionina, cistina, lisina quando comparado às proteínas padrão como carne, ovos ou leite, porém, ela é superior a todas as proteínas vegetais (FAO, 2008). Ela é rapidamente digerível, e não existem restrições quanto às quantidades consumidas, sendo um alimento natural seguro podem-se ingerir duas colheres de sopa ou mais a cada dia, adicionando-a a frutas, sucos vegetais batidos no liquidificador ou à vontade.

Diversos estudos clínicos efetuados com crianças do Vietnã, do Zaire, República Centro-Africano, Ruanda, com desnutrição protéico-calórica grave, inclusive em situações com kwashiorkor e marasmus tem sido realizados usando *Spirulina* e em todos os casos se constatou que havia melhora da saúde das pessoas, demonstrando que ela tinha um efeito muito melhor do que a soja (HEIERLI; WEID, 2007; HENRIKSON, 2009; HUG; WEID, 2012).

A *Spirulina* pode produzir 20 vezes mais proteína do que a soja por hectare (HENRIKSON, 1989) podendo-se chegar até 18-36 tons de peso seco por hectare em locais onde o clima permite. Não mais que poucas gramas de *Spirulina* por dia é suficiente para suprir as necessidades nutricionais diárias de uma criança, o que significa dizer que cada metro quadrado de *Spirulina* poderá suprir as necessidades nutricionais diárias de 2-3 crianças durante um ano, em locais de clima quente (<http://www.antenna.ch/en/documents/Mono3cUK.pdf>).

O consumo de biomassa fresca de *Spirulina* na forma de pasta é altamente desejável porque não tem cheiro nem gosto se comparado com o produto seco. Mudanças de hábito na alimentação são difíceis, mas isso poderia ser iniciado pelas crianças. Uma vez convencidas

das qualidades de *Spirulina*, as mães poderiam incorporá-la no mingau de seus filhos, ou sopas, cuscuz e doces.

Em casos de má nutrição os efeitos do consumo de *Spirulina* são rapidamente visíveis (BELAY, 2002; SIMPORE et al. 2006; SOTIROUDIS; SOTIROUDIS, 2013; NUHU, 2013), o que seria um grande estímulo para a aceitação desse produto. Biomassa seca de *Spirulina* tem uma aceitação menor, por conta do seu cheiro forte característico. Mesmo assim, ela poderia ser incorporada a diversos alimentos e resultar em ampla aceitabilidade.

Com o desenvolvimento de projetos locais de produção artesanal, será possível estimular o comércio local de *Spirulina* gerando renda adicional para pequenos produtores. Adicionalmente, biomassa seca poderá ser comercializada em feiras livres e supermercados da região, da mesma forma que se vende farinha de mandioca, feijão e fubá.

## 6 CONCLUSÕES

a) Das vinte e quatro cepas de microalgas isoladas de diferentes ambientes aquáticos do Bioma Caatinga (estado da Paraíba e Rio Grande do Norte) nove podem ser o primeiro registro para a região estudada;

b) foram obtidos cultivos monoespecíficos de três clones da espécie *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, quatro de *Synechococcus nidulans*, três de *Scenedesmus acuminatus* e duas de *Lagerheimia longiseta*;

c) Quatorze cepas dentre as que foram isoladas do material coletado no bioma Caatinga foram cultivadas em condições laboratoriais controladas visando à produção de biomassa para análises dos estes metílicos de ácidos graxos, evidenciando-se respostas diferenciadas nos parâmetros de crescimento e na diversidade e nos teores de ácidos graxos para todas as microalgas, e evidenciando-se a cepa D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) como a mais promissora para produção de biodiesel, por ter apresentado um percentual total de ácidos graxos elevado em relação à soja. As cepas D133WC (*Lagerheimia longiseta*) e D112Z (*Synechococcus nidulans*), também apresentaram valores expressivos de ácidos graxos em relação à soja.

d) as cepas mais promissora para a obtenção de outros co-produtores de interesse biotecnológico a exemplo dos ácidos ômeegas foram a D26Z (*Desmodesmus* sp cf *costato-granulatus*), D29Z (não identificada), D37Z (*Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* ), D39Z *Planktothrix isothrix* e D76Z (*C. cf hypnosporum*). Destas, a cepa D39Z apresentou o ácido  $\gamma$ -linolênico, um ácidos graxo essencial de alto valor de mercado;

e) variações na diversidade de ácidos graxos foram observadas entre as clorofíceas e a cianobactérias, sendo que nas primeiras foram mais frequentes os ácidos graxos palmítico, oleico e linolênico e nas últimas, os ácidos graxos: palmítico, palmitoleico e oleico, sendo este último observado em baixas concentrações em todas as cepas estudadas;

f) os clones de *Chlorococcum cf. hyposporum* e *Synechococcus nidulans* diferiram na diversidade e nos teores de ésteres metílicos de ácidos graxos evidenciando que a composição bioquímica de uma mesma espécie isolada de lugares distintos ou de um mesmo local pode apresentar diferenças entre si, mesmo sendo cultivadas em condições semelhantes;

g) as microalgas cultivadas apresentaram uma diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos sendo predominantes os ácidos: palmítico, palmitoléico, linoleico, linolênico e gama-linolênico, sendo que alguns destes ácidos estão incluídos na família dos ácidos ômega de interesse na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, e ainda com potencial para produção de biodiesel;

h) as microalgas *Spirulina platensis*, *Planktothrix isothrix* e *Scenedesmus acuminatus*, quando submetidas aos cultivo em meios alternativos preparados em estrato de solo regado com vinhaça, estrato de biocomposto e extrato de esterco de galinha exibiram padrões de crescimento distintos, sendo os melhores rendimentos observados em meios preparados com extrato de biocomposto. Em nenhum caso, porém, os rendimentos igualaram-se aos controles evidenciando que mais esforços devem ser dispensados visando a otimização desses meios;

i) no que concerne à aceitabilidade de *S. platensis* entre trabalhadores rurais do semiárido paraibano, a pesquisa evidenciou elevados percentuais de avaliação global do teste de aceitabilidade nas três versões testadas: biomassa fresca, biomassa seca e biomassa seca adicionada a alimentos indicando os dados que há possibilidades de inserção de cultivos de *S. platensis* em comunidades rurais da Caatinga;

j) o teste de atitudes frente à *Spirulina*, juntamente com os dados do teste de aceitabilidade, evidenciam uma forte abertura a mudanças em comunidades rurais da região semiárida da Paraíba, sugerindo que a implantação de políticas públicas de apoio para o desenvolvimento de cultivos artesanais de *Spirulina* poderá representar mais uma fonte de alimento, de renda e de sobrevivência na seca para populações rurais que vivem na Caatinga.

## REFERÊNCIAS

ADAMSSON, M. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). **Ecological Engineering**, v. 16, n. 2, p. 243-254, 2000.

ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factors**, v. 11, n. 96, 2012.

AFFE, H. M. J. **Caracterização da comunidade fitoplanctônica com ênfase nas microalgas potencialmente tóxicas em áreas de cultivo de ostras na baía de Camaru**. 2012. 85p. Dissertação (Mestrado em Sistemas aquáticos Tropicais) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2012.

AIDAR, E. **Produção primária em função de diferentes métodos de incubação em uma região estuarina**. 1980. 270p. Dissertação (Mestrado em oceanografia) - Instituto Oceanográfico São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

ALCÂNTARA, S. R. S.; FERREIRA, L. M. S. L.; OLIVEIRA, O. C. Caracterização limnológica e comunidades fitoplanctônicas da represa do Cascão – Saboeiro – Salvador-BA. **Candombá – Revista Virtual**, v. 7, n. 1, p. 99-108, 2011.

ALMEIDA, F. F. **Fitoplâncton de um lago de inundação amazônico (Lago Catalão – Amazonas – Brasil): estrutura da comunidade, flutuações espaciais e temporais**. Pós Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Universidade Federal do Amazonas. 2008.

ALVES, F. R. R.; NOGUEIRA, I. S. Florística e Diversidade das Cyanophyta e Chlorophyceae Planctônicas do Lago dos Tigres durante Seca e Chuva de 2008/2009. **Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão do VII Congresso de Pesquisa, Ensino e extensão Conhecimento e Desenvolvimento Sustentável**, p. 1519 – 1532, 2010.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. 1º ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.

ANDRADE, R.S. **Dinâmica do fitoplâncton, qualidade de água e a percepção ambiental da comunidade de pescadores em açudes da bacia do rio taperoá**. 2008. 150p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente) - PRODEMA, Universidade Federal da Paraíba/Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2008.

ANTIA, N. J.; BERLAND, B. R.; BONIN, D. J.; MAESTRINI, S. Y. Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. **Phycologia**. v. 16, n. 1, p. 105-111, 1977.

AQUINO, E. P.; LACERDA, S. R.; FREITAS, A. I. G. Cianobactérias das lagoas de tratamento de esgoto no semi-árido nordestino (Ceará, Brasil). **Revista de Botânica – Journal of Botany INSULA**, Florianópolis, n. 39, p. 34-46. 2010.

AQUINO, E. P.; OLIVEIRA, E. C. C.; FERNANDES, U. L.; LACERDA, S. R. Fitoplâncton de uma lagoa de estabilização no nordeste do Brasil. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol.**, v.15, n.1, p.71-77, 2011.

ARAÚJO, F. B. **Efeitos do enriquecimento com nutrientes (N e P) em diferentes condições de luz sobre o crescimento do fitoplâncton em um reservatório eutrófico no semi-árido brasileiro.** 2009. 36p. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

ARMBRUST, E. V. The life of diatoms in the world's oceans. **Nature**, v. 459, p. 185–192, 2009.

AVALA, D.; MELLO, P.C.; WAGENER, K. The Relevance of the CO<sub>2</sub> Partial Pressure of Sodium Bicarbonate Solutions for the Mass Cultivation of the Microalga *Spirulina*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 5, p. 447-450, 1997.

EVERY, A. M.; WILLETTS, S. A.; EVERY, S. V. Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast *gpx3* reveals its functional importance. **Journal of Biological Chemistry**, 279, v.45, p. 46652-8, 2004.

AYEHUNIE, S.; BELAY, A.; BABA, T. W.; RUPRECHT, R. M. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis*. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 18, n. 1, p. 7-12, 1998.

BAGES, M.; DRENO, J. P.; GONZALES-RODRIGUES, E.; MAESTRINI, S. Y.; ROBERT, J. M. Biomass and production of oyster pond algae in the Bourgneuf bay (Vendée). Growth potential and nutrient uptake bioassayed with the diatoms *Navicula ostrearia* Bory, *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. C. R. hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences Paris Série D, v. 287, n. 16, p.1413-1415, 1978.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 245-279, 2002.

BARBOSA, J. E. L.; MEDEIROS, E. S. F.; BRASIL, J.; CORDEIRO, R. S.; CRISPIM, M. C. B.; SILVA, G. H. G. Aquatic systems in semi-arid Brazil: limnology and management. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.24, n.1, p.103-118, 2012.

BARROCAL VM, GARCÍA-CUBERO MT, GONZÁLEZ-BENITO G, COCA, M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, n. 27, p. 851–856, 2010.

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana.** 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

BARTOZEK, E. C. R. **Efeitos do cultivo experimental de peixes em tanques-rede sobre a estrutura da comunidade fitoplânctônica em um braço do reservatório de Salto Caxias,**

**região Sudoeste do Estado do Paraná.** 2012. 78 p. Dissertação - Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

BASTOS, R. G.; PAIVA, P. R.; RIGO, M.; VEIGA, G.; QUEIROZ, M. I. Growth of cyanobacteria *Aphanothece* sp. on exogenous sugars. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 156-161, 2011.

BASTOS, R. G.; RIZZO, P.; PARAZZI, C.; VALSECHI, O. A. Cultivo mixotrófico e heterotrófico de cianobactéria em água residuária da indústria setor sucroenergética. In: XVII SINAIFERM, 17, 2009, Natal. **Anais...** Natal: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 11, n. 2, p. 250-255, 2013.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology.** New York: Cambridge University Press, 1995. 293p.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 407-415, 2006.

BELAI, H. T. **Uso de subprodutos da indústria sucroalcooleira no manejo de um neossolo quartzarênico órtico típico.** 2006. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2006.

BELAY, A. The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, 2002.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235-41, 1993.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. Algas de agua doce: Identificação e uso como bioindicadores. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1265-1266, 2010.

BELTRÃO, M. I. **Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de industria de suco de laranja concentrado.** 1992. 120 p. Mestrado (Dissertação) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

BEM-AMOTZ, A.; FISHLER, R.; SCHNELLER, A. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. **Marine Biology**, v. 95, p. 31-36, 1987.

BEN-AMOTZ, A. Dunaliella  $\beta$ -caroteno: from Science to commerce. p. 401-410, 1999. In: SECKBACK, J. **Enigmatic Microorganisms and Life in extreme Environments.** Kluwer, Netherlands, 1999.

BENEMANN, J. R. The future of microalgal biotechnology. In: Cresswell, R. C; Ress, T. A. V., Shah, N., **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. 1<sup>o</sup> ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1989. p. 317-337.

BENEMANN, J. Microalgae for Biofuels and animal feeds. **Energies**, v.6, n.11, p.5869-5886, 2013.

BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 47–53, 1987.

BERLAND, B. R.; BONIN, D. J.; MAESTRINI, S. Y.; POINTIER, J. P. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. II Limitation nutritionnelle et viabilité de l'inoculum. **International Review of Hydrobiologia**, v. 58, n. 2, p. 203-220, 1973.

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

BERTOLIN, T. B. P.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. **Ciência e Agrotecnologia** [online], v. 29, n. 1, p. 118-125, 2005.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. 2<sup>o</sup> ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, R. C.; org., et al. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online], v. 1, p. 49-60, 2010.

BIGOGNO, C.; Khozin-Goldberg, I.; Cohen, Z. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae, Chlorophyta). **Phytochemistry**, v. 60, p. 135–143, 2002.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A, N.; ARAGÃO-TAVARES, N. K. C.; CORDEIRO-ARAÚJO. M. K. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, n.1. 2014.

BLINN, D. W. Growth responses to variations in temperature and specific conductance by *Chaetoceros muelleri* (Bacillario-phyceae). **British Phycological Journal**, v. 19, n. 1, p. 31–35, 1984.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. Ribosomal RNA homologies and the evolution of the filamentous blue-green bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, v. 10, p. 283-291, 1978.

BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

BONINI, M. A.; BASTOS, R. G. Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de Glicose. **Semina**, v. 33, n. 2, p. 151-160, 2012.

BORGES-CAMPOS, V.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural** [online], v. 40, n. 2, p. 309-317, 2010.

BOROWITZKA, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. p. 153–196, 1988. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

BOROWITZKA M. A. Commercial-scale culture of cyanobacteria. **Bulletin de l'oceanographique**, v. 19, p. 507-515, 1999.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. *Dunaliella*. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 27-58. 1988a.

BOROWITZKA, M. A., BOROWITZKA, L. J. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *D. salina*. p. 139–150, 1988. In: STADLER, T.; MOLLION, J.; BERDUS, M. C.; KARAMANOS, Y.; MORVAN, H.; CHRISTIANE, D. **Algal Biotechnology**. Barking: Elsevier Applied Science, 1988b.

BOROWITZKA, M. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae, In: **Chemicals from Microalgae**, Taylor & Francis Ltd, p. 313 – 352. 1999.

BOROWITZKA, M. Economic evaluation of microalgal processes and products. In: **Chemicals from Microalgae**, Taylor & Francis Ltd, p. 387 - 409. 1999.

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

BOUGIS, P. **Marine Plankton Ecology**. Amsterdam and New York: North-Holland Publishing Company/American Elsevier Publishing Company, 1976. 355 p.

BOUVY, M.; MOLICA, R.; OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 20, p. 285-297, 1999.

BOUVY, M.; PAGANO, M.; TROUSSELLIER, M. Effects of a cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). **Aquatic Microbiology Ecology**, v. 25, p. 215-227, 2001.

BRAND L. E. The salinity tolerance of 46 marine-phytoplankton isolates. **Estuarine Coastal and Shelf Science**. v. 18, p. 543-556, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (Dispoa). Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos

analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, Setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, Janeiro de 2001. Seção I, nº 7-E, p.45-53.

BRITZ, P.J. The suitability of selected protein sources for inclusion in formulated diets for the South African abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v. 140, p. 63–73, 1996.

BROWN, M. R. Nutritional value of microalgae for aquaculture. 2002 In: CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GAXIOLA-CORTÉS, M. G.; SIMOES, N. Avances en Nutrición Acuicola VI. **Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola**. 3 al 6 de Septiembre del. ancún. Quintana Roo, México, 2002.

BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v. 34, p. 1005-1013, 1993.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 145, p. 79-99, 1991.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p. 315-331, 1997.

BROWN, M. R.; MCMCAUSLAND, M. A.; KOWALSKI, K. The nutritional value of four Australian microalgal starins fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. **Aquaculture**, v. 165, p. 281 – 293, 1998.

BURLEW, J. S. **Algal culture from laboratory to pilotplant**. Washington: Carnegie Institution of Washington, 1953. 357 p.

CABANELAS, I. T.; RUIZ, J.; ARBIB, Z.; CHINALIA, F. A.; GARRIDO-PEREZ, C.; ROGALLA, F. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 429–436, 2013.

CABRALES, M. M. Q.; GONZÁLEZ, M. F. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. **Medisan**, v. 8, n. 3, p. 27-31, 2004.

CAERS, M.; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L) spat. **Aquaculture**, v.170, p. 307-322, 1999.

CÂMARA, F. M. M.; MOURA, A. N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Ficoflórula planctônica do rio Parnaíba, estado do Piauí-Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 16, p. 3-21, 2002.

CAMPELO, M. J. A.; KOENING; M. L.; PASSAVANTE, J. Z. O. Microalgas da Praia de Carne de Vaca - Goiana- Pernambuco, Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 14, n. 15, p. 1-17, 2001/2002.

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

CARDOSO, M.B. **Ficoflórula da lagoa de estabilização de São José dos Campos, Estado de São Paulo, Brasil, exclusive Bacillariophyceae**. 1979. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

CARLOS, A. C. **Dinâmica da população de cianobactérias em um reservatório eutrófico do semiárido no período da seca**. 2013. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia), Universidade Estadual da Paraíba. 2013

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v.270, p. 64–7, 1994.

CARVALHO, M. C. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios no Estado de São Paulo**. 2003. 167 p. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental), Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2003.

CASANOVA, M. A.; MEDEIROS, F. Recentes evidências sobre os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3na doença cardiovascular. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, p. 74-80, 2011.

CASTRO, A. R. C. **Utilização de adubo orgânico em cultura de fitoplâncton**. Rio de Janeiro: PESAGRO, 1979. 2p

CAVATI, B.; FERNANDES, V. O. Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno - Linhares, Estado do Espírito Santo, Brasil): variação espacial e temporal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 439-448, 2008.

CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; LAW, C. L.; HASSEL, D. G.; A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 1, p. 1–18, 2011.

CHAUMONT, D. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 593-604, 1993.

CHELLAPPA, N. T.; BORBA, J. M.; ROCHA, O. Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** [online], v.68, n.3, p. 477-494, 2008.

CHELLAPPA, N. T.; COSTA, M. A. M. Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a eutrohicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Oecologica**, v. 24, p. 3-10, 2003.

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

CHISTI, Y. Fuels from microalgae. **Biofuels**, v. 1, n. 2, p. 233–235, 2010.

CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 369-379, **1987**.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p.355-366, 2003.

CIFERRI, O. Spirulina, the Edible Microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 551-578, 1983.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potencial of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 503-526, 1985.

CLEVELAND, J. S.; PERRY, M. J. Quantum yield, relative specific absorption and fluorescence in nitrogen-limited *Chaetoceros gracilis*. **Marine Biology**, v. 94, p. 489-497, 1987.

COHEN, P.; HOLMES, C. F. B.; TSUKITANI, Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. **Trends Biochemical Sciences**, v. 15, p. 98-102, 1990.

COHEN, Z. Production potential of eicosapentaenoic acid by *Monodus subterraneus*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 941-945, 1994.

COHEN, Z., KHOZIN-GOLDBERG, I., ADLRESTEIN, D., AND BIGOGNO, C. The role of triacylglycerols as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 740-743, 2000.

COQUEMALA, V. **Variação sazonal (inverno e verão) da densidade e biomassa do fitoplâncton no Reservatório Piraquara I**. 2003. 46 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2003.

CORRÊA, R. G. **Flora fitoplanctônica e do sedimento em piscicultura comercial de catfish, *Ictalurus punctatus* no município de Palhoça, SC, Brasil**. 2011. 89 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Universidade federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2011.

COSTA, D. F.; DANTAS, E. W. Diversity of phytoplankton community in different urban aquatic ecosystems in metropolitan João Pessoa, state of Paraíba, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliens** [online], v. 23, n. 4, p. 394-405, 2012.

COSTA, I. A. S. et al. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian Journal of Biology** [online], v. 66, n.1b, p. 211-219, 2006.

COSTA, R. A. A. M.; KOENING, M. L.; MACEDO, S. J. Urban secondary sewage: an alternative medium for the culture of *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) and *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**[online], v. 47, n. 3, p. 451-459, 2004.

COSTARD, G. S.; MACHADO, R. R.; BARBARINO, E.; MARTINO, R. C.; LOURENÇO, S. O. Chemical composition of five marine microalgae that occur on the Brazilian coast. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, v. 4, p. 191-201, 2012.

CRAGGS, R.J.; HEUBECK, S.; LUNDQUIST, T.J.; BENEMANN, J.R. Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds. **Water Science and Technology**, v. 63, p. 660–665, 2011.

CRESSWELL, R. C., SYRETT, P. J. Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatoms *Phaeodactylum tricoratum*. **Plant Science Letters**, v. 14, n. 4, p. 321-325, 1979.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas 72 acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 40. p. 158-162, 2006.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. C. Variação sazonal dos grupos funcionais fitoplanctônicos em braços de um reservatório tropical de usos múltiplos no estado de São Paulo (Brasil). **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 25, n. 4, p. 822-831, 2011.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: **Anais... XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, Caxias do Sul: Editora da UCS, 2011. 1 CD-ROM

DANTAS, Ê. W.; MOURA, A. N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; ARRUDA NETO, J. D. T.; CAVALCANTI, A. D. Temporal variation of the phytoplankton community at short sampling intervals in the Mundaú reservoir, Northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 970-982, 2008.

DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1163 -1174, 2007.

DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J. **Comunidade Fitoplanctônica do reservatório de Barra Bonita e sua relação com a composição e quantidade de polissacarídeos extracelulares e agregados gelatinosos**. 2006. 99 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959 – 1967, 2006.

DESIKACHARY, T. V. Cyanophyta. **Indian Council of Agricultural Research**, 1959.

DOMINGUES, C. D., TORGAN, L. C. *Chlorophyta* de um lago artificial hipereutrófico no sul do Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 67, n. 1, p. 75-91, 2012.

EL-DASH, A.; GERMANI, R. **Tecnologia de Farinhas Mistas: Uso de Farinhas Mistas na Produção de Biscoitos**. Brasília: EMBRAPA - SPI, v. 6, 1994. 47 p.

EL-SAYED, A. F. M. Evaluation of soybean meal, spirulina meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 127, p. 169–176, 1994.

FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; VEIGA, M. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrients concentrations. **Aquaculture**, v. 42, p. 207-215, 1984.

FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and high nutrient concentrations. **Aquaculture**, v. 50, p. 1-11, 1985.

FABREGAS, J.; TORIBIO, L.; ABALDE, J.; CABEZAS, B.; HERRERO, C. Approach to biomass production of the marine microalga *suecica* Kylin (Butch) using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch culture. **Aquacultural Engineering**, v. 6, p.141-150, 1987.

FALCÃO, D. P. M.; MOURA, A. N. Estrutura fitoplanctônica da Bacia do Rio Brígida, Sertão do Estado de Pernambuco. p.272, 1999. In: **Anais** de Resumos do VII Congresso Brasileiro de Limnologia, Florianópolis, 1999.

FAO. **Tropical Forest Resources Assessment project** (in the framework of GEMS) - Forest resources of tropical Africa. Rome. 1981.

FAO, The state of food and agriculture. **BIOFUELS: prospects, risks and opportunities**. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2008. 240p.

FARIA, G. R.; PAES, C. R. P. S.; CASTRO, D. J. F. A.; TINOCO, N. A. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Effects of the availability of CO<sub>2</sub> on growth, nutrient uptake, and chemical composition of the marine microalgae *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata*, two potentially useful strains for biofuel production. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 65-75, 2012.

FAWLEY, M. W. Effects of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricomutum* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 20, p. 67-72, 1984.

FELISBERTO, S. A.; RODRIGUES, L. Periphytic algal community in artificial and natural substratum in a tributary of the Rosana reservoir (Corvo Stream, Paraná State, Brazil). **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 32, p. 373-385, 2010.

FELISBERTO, S. A.; RODRIGUES, L.; LEANDRINI, J. A. Chlorococcales registradas na comunidade perifítica, no reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil, antes e após o represamento das águas. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 23, p. 275-282, 2001.

FERNANDES, S. **As famílias Chlorococcaceae e Coccomyxaceae no Estado de São Paulo**: levantamento florístico. 2008.158 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

FERRAGUT, C.; LOPES, M. R. M.; BICUDO, D. C.; BICUDO, C. E. M.; VERCELLINO, I. S. Ficoflórula perifítica e planctônica (exceto Bacillariophyceae) de um reservatório oligotrófico raso (lago do IAG, São Paulo). **Hoehnea**, v. 32, p. 137-184, 2005.

FERREIRA, A. C. S. **Leitura de minuto: cianobactérias**. Fortaleza: Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos (Governo do Estado do Ceará), v. 10, 2008.

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V. Revisão microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias** [online], v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.

FIDALGO J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 166, p. 105 – 116, 1998.

IORE, M. F.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A. S. The cyanobacterial genus *Brasilonema* gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 789-798, 2007.

FIORESI, T. B. Uso de meio a base de esterco suíno no cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (CHLOROPHYTA) em laboratório. 2007 69 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

FLYNN, K. J.; SYRETT, P. J. Development of the ability to take up L-lysine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v.89, p. 317-325, 1985.

FLYNN, K. J.; SYRETT, P. J. Characteristics of the uptake system for L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v. 90, p. 151-158, 1986a.

FLYNN, K. J.; SYRETT, P. J. Utilization of L-lysine and L-arginine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v. 90, p. 159-163. 1986b.

FOX, R. D. **Spirulina production & potencial**. Aix-em-Provence: Edisud, 1996, 231 p.

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

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova** [online]. v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

GAETA, S. A. **Comparação das respostas de crescimento e fotossíntese de três clones de *Phaeodactylum tricornutum*** Boblin. 1985. 106 p. Dissertação - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry, **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 471-499, 2005.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. **Akademische Verlags- gesellschaft**, Leipzig, v. 14, 1196 p., 1932.

GENTIL, R. C. Estrutura da comunidade fitoplanctônica de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, em dois períodos: primavera e verão. 2007.186 p. Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica , Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

GENUÁRIO, D. B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética**. Dissertação (Mestrado – Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2010.

GHAZALA, B.; NAILA, B.; SHAMEEL, M. Fatty acids and biological activities of crude extracts of freshwater algae from Sindh. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 1201–2012, 2010.

GOLDEMBERG, J. **Bioenergia no Estado de São Paulo**. São Paulo: Imprensa Oficial de São Paulo, 2008.152p.

GOLDMAN, J. C. Physiology aspects in algal mass cultures. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. **J. Algae Biomass**. Amesterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. p. 343-359

GOLDMAN, J. C. Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. **Limnology and Oceanography**, v. 22, p. 932-935, 1977.

GOLDMAN, J. C., GILBERT, P. M. Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**. v. 27, p. 814-827, 1982.

GOLDMAN, J. C.; RYTHER, J. H. Temperature-influenced species competition in mass cultures of marine phytoplankton. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 18, p. 1125- 1144, 1976.

GOLDMAN, J. C.; DENNETT, M. R.; RILEY, C. B. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO<sub>2</sub> supply in intensive microalgal cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 3, p. 619-631, 1982.

GOLDMAN, J. C.; MANN, R. Temperature-influenced variations in speciation and chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 46, p. 29-39, 1980.

GOMES, P. P. **Variação espacial e temporal da comunidade fitoplanctônica da Lagoa Bonita, DF**. 2007. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade de Brasília. Brasília, 2007.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E.; MAESTRINI, S. Y. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. **Aquaculture**, v. 36, p. 245-256, 1983.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 269-274, 2009.

GRIFFITHS, D. J. Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory culture of diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v. 21, n. 2, p.91-97, 1973.

GROSS, F. Notes on the culture of some marine organisms. **Journal of Marine Biology**, v. 21, n. 2, p.753-768, 1937.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, 1975. p.29-60.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

GUIRY, M. D. **How many species of algae are there?** p.1057–1063. Article first published online: 20 SEP 2012 | DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 160–186, 2006.

HANKAMER, B.; LEHR, F.; RUPPRECHT, J.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C. AND O. KRUSE. Photosynthetic biomass and H<sub>2</sub> Production by Green Algae: From Bioengineering to Bioreactor Scale-Up. **Physiologia Plantarum**, v. 131, p. 10-21, 2007.

HANSEN, J.; SCHADE, D.; HARRIS, C.; MERKEL, K.; ADAMKIN, D.; HALL, R.; LIM, M.; MOYA, F.; STEVENS, D.; TWIST, P. Docosahexaenoic acid plus arachidonic acid enhance preterm infant growth. **Prostaglandins, Leukotriens, Essential Fatty Acids**, v. 57, n. 157, 1997.

HARGRAVES, P. E.; FRENCH, F. Observation on the survival of diatom resistant spores. **Nova Hedwigia**, v. 53, p. 229-239, 1975.

HASSUDA, S.; REBOUÇAS, A. C.; CUNHA, R. C. A. Aspectos qualitativos da infiltração da vinhaça de cana no Aquífero Bauru. **Revista do Instituto Geológico**, v. 11, n. 2, p. 5-20, 1990.

HEIERLI, U.; WEID, D. VON DER. Sustainable approaches to combat malnutrition : small-scale production and marketing of *Spirulina*. **Antenna Technologies**, 2007, 84p.

HENRIKSON, R. ***Spirulina World Food***: How this micro algae can transform your health and our planet? California: Ronore Enterprises. 2010. 194p.

HENRIKSON, R. ***Earth food Spirulina***. California: Ronore Enterprises, 1989. 180 p.

HENRIKSON, R. ***Earth Food Spirulina***: How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet. California: Ronore Enterprises 2009. 97p.

HENRY, R.; USHINOHAMA, E.; FERREIRA, R. M. R. Fitoplâncton em três lagoas marginais ao Rio Paranapanema e em sua desembocadura no Reservatório de Jurumirim (São Paulo, Brasil) durante o período prolongado de seca. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 399-414, 2006.

HENSON, B. J.; WATSON, L. E.; BARNUM, S. R. Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences. **Current Microbiology**, v. 45, p. 161–164, 2002.

HERBERT, R. A. Nitrogen cycling the marine ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 563-590, 1999.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245-2253, 2011.

HINDAK, F. **Studies on the Chloroccal Algae** (Chlorophyceae). Bratislava: Veda Publishing House of The Slovak Academy of Sciences, 1990. 225 p.

HONDA, R.Y.; AZEVEDO, M. T. P. Estudos taxonômicos em culturas de Cyanobacteria provenientes de um reservatório oligotrófico no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 31, p. 151-169, 2004.

<http://www.antenna.ch/en/documents/Mono3cUK.pdf>

<http://www.aquacarotene.com/corporate.html>

<http://www.atns.net.au/biogs/A000955b.htm>

<http://www.austasiaaquaculture.com.au/book.php?newsID=4490>,

[http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/V\\_FANSA.pdf](http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/V_FANSA.pdf)

[http://www.gtamart.com/mart/products/chlorella\\_vulgaris](http://www.gtamart.com/mart/products/chlorella_vulgaris)

<http://www.spirulinasource.com/earthfoodintro.html>

<http://www.spirulinasource.com/earthfoodintro.html>;

<http://www.spirulinasource.com/microfarms.html>

<http://www.tierramerica.net/2002/1215/particulo.shtml>

<http://www.tratamentodeesgoto.com.br>

HU, Q.; SOMMERFIELD, M.; JARVIS, E.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgae triacylglycerols as feedstock for biofuel production; perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.

HUG, C.; WEID, D. VON DER. **Algae as an Approach to Combat Malnutrition in Developing Countries Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis** 21. Jg., Heft 1, Juli 2012

HUSZAR, V. L. M.; NOGUEIRA, I. S.; SILVA, L. H. S. Fitoplâncton de rede da Lagoa do Campelo, Campos, Rio de Janeiro, Brasil: uma contribuição a seu conhecimento. **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 1, n. 2, suppl.1, p. 209-219, 1988.

JAYASHREE, J.; MANORANJAN, N.; HIMANSU, S. P.; NILOTPALA, P.; CHANDRAGIRI, S.; PRASANNA, KU.; PANDA, B. V. S. K RAO; RACHAPUDI, B. N.; PRASAD, L. B. S. Microalgae of Odisha Coast as a Potential Source for Biodiesel Production. **World Environment**, v. 2, n. 1, p. 12-17, 2012.

KAWAGUCHI, K. Microalgae production systems in Asia. p. 25-23. 1980. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. **Algae Biomass**. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland biomedical Press, 1980.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642-656, 2013.

KLEIN, V. L. M.; GONZALEZ, A. A. W. Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* Prings em diferentes meios de cultura. **Revista Ciência Agronômica**, v. 24, p. 91-100, 1993.

KOENING, M. L.; MAIA, P. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrahele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. **Revista Biológica Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 23-38, 1990.

KOENING, M. L.; MAIA, P. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrahele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. **Revista Biológica Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 23-38, 1990.

KOLETZKO, B.; BRAUN, M. Arachidonic acid and early human growth: is there a relation? **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 35, p. 128-31, 1991.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gärtner, H. Heying; D. Möllenhauer. **Süßwasserflora von Mitteleuropa**, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1999. 548 p.

KOMARÉK, J.; ANAGNOSTIDISn, K. Cyanoprokaryota. Teil: Oscillatoriales. In : BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. **Süßwasserflora von Mitteleuropa** München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759 p.

KORU, E. **Earth Food Spirulina (Arthrospira)**: Production and Quality Standarts, Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), 2012.

LACAZ-RUIZ, R.; KIYAN, C. Utilisation de cendres dans le milieu de culture pour *Spirulina platensis*. **International Journal of Experimental Botany BA Argentina**, v. 59, n. 1/2, p. 33-37, 1996.

LACAZ-RUIZ, R.; KORNFELD, M. E.; ZANETTI, M. A. *Spirulina* grown on citrus industry effluent. **Cyanonews**, v. 9, n. 2, p. 1-3, 1993.

LACAZ-RUIZ, R.; SHIROMA, N. N.; CARLQUIST, T. A.; LIMA, F. R. Evaluation of culture media for *Spirulina* spp. using a minimum cost formulation program. **International Journal of Experimental Botany BA Argentina**, v. 65, p. 77-81, 1999.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L. PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LEÃO, B. M. **Biomassa, Taxonomia e Ecologia do Fitoplâncton do Estuário do Rio Igarassu (Pernambuco-Brasil)**. 2004. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2004.

LIAAEN-JENSEN, S.; EGELAND, E. S. 1999. p. 145-172. In: COHEN, Z. **Valuable chemicals from microalgae**, 1<sup>o</sup> ed, London: Taylor & Francis, 1999.

LICHTENSTEIN, A. H.; AUSMAN, L. M.; CARRASCO, W.; JENNER, J. L.; ORDOVAS, J. M.; SCHAEFER, E. J. Hypercholesterolemic effect of dietary cholesterol in diets enriched in polyunsaturated and saturated fat. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 14, n. 1, p. 168-75, 1994.

LIRA, G. A. S. T.; ARAÚJO, E.L.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOURA, A. N. Phytoplankton abundance, dominance and coexistence in an eutrophic reservoir in the state of Pernambuco, northeast Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 83, n.4., 2011.

LOMBARDI, A. T. **Influência de fósforo e sílica na produção de lipídios por células de *Chaetoceros gracilis* cultivadas em cultura contínua tipo “cage” turbidostato**. 1990. 82 p. Dissertação - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1990.

LOPES-MUÑOZ, I.; ABALDE, J.; HERERRO, C. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com diferentes temperaturas e intensidades de luz. **Nova Acta Científica Compostelana**, v. 3, p. 59 – 65, 1992.

LORENZI, A. S. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa Em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento Microcystis e genótipos potencialmente produtores de microcistina**. 2008. 174 p. Dissertação (Doutorado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear em Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LOUHERANTA, A. M.; PORKKALA-SARATAHO, E. K.; NYSSONEN, M. K.; SALONEN, R. M.; SALONEN, J. T. Linoleic acid intake and susceptibility of very-low-density and low-density lipoproteins to oxidation in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 698-703, 1996.

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

LOURENÇO, S. O., BARBARINO, E., LAVÍN, P. L., LANFER MARQUEZ, U. M., AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17-32, 2004.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U. M. L.; MANCINI-FILHO, J.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, p. 153 - 158, 1997.

LU, J.; TAKEUCHI, T. Spawning and egg quality of the tilapia, *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina platensis* throughout three generations. **Aquaculture**, v. 234, p. 625–640, 2004.

LUDOVICE, M. T. F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MACEDO, D. R. G. **Microcistina na água e biomagnificação em peixes de reservatórios de abastecimento público do estado da Paraíba**. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – PRODEMA, Universidade Federal da Paraíba/ Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2009.

MAGALHÃES, A. B. S. **Ocorrência de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água para consumo humano no município de Viçosa-MG**. 2007. 143p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2007.

MAGALHÃES, A. B. S. **Taxonomia, estrutura e dinâmica do fitoplâncton e do zooplâncton em um sistema piloto de tratamento de esgoto sanitário em lagoas de polimento**. 2011. 221 p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MAKAREVICIENE, V.; ANDRULEVICIUTE, V.; SKORUPSKAITE, V.; KASPEROVICIENE, J. Cultivation of Microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* as a Potential Biofuel Feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21-27, 2011.

MALTCHIK, L.; BARBOSA, C.; BAPTISTA, C.; ROLON, A.; STENERT, C.; MEDEIROS, E. S. F.; COSTA-NETO, E. Adaptive success and perceptions on the hydrological disturbances by riverine populations in Brazilian semi-arid streams. **Neotropical Biology And Conservation**, v. 4, p. 13-19, 2009.

MALTCHIK, L.; MEDEIROS, E. S. F. Diversidade, estabilidade e atividade reprodutiva de peixes em uma poça fluvial permanente no leito de um riacho efêmero, Riacho Avelós, Paraíba, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, p. 20-28, 2006.

MARGALITH, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 431-438, 1999.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos - Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. 497 p.

MARQUARDT, J.; PALINSKA, K. A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 187-397, 2007.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição** [online], v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. Família Scenedesmaceae (Chlorophyceae, Chlorococcales) do lago Água Preta, município de Belém, Estado do Pará. **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 11, n. 2, p. 135-152, 1997.

MASCARENHAS, G. L.; CASÉ, M. C. C.; MARTINS, L. R.; FERREIRA, J. T.; LOPES, D. V. Caracterização do fitoplâncton das bacias do rio São Francisco, Moxotó e Paraíba, inseridas no projeto de integração do rio São Francisco. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, n. 5, p. 1050-1068, 2013.

MASLOVA, I. P.; MOURADYAN, E. A.; LAPINA, S. S.; KLYACHKO-GURVICH; LOS, D. A. Lipid Fatty Acid Composition and Thermophilicity of Cyanobacteria Russ. **Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 353, 2004.

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

MEDEIROS, E. S. F.; MALTCHIK, L. Diversity and stability of fishes (Teleostei) in an temporary river of the Brazilian semiarid region. **Iheringia - Série Zoologia**, v. 90, p. 157-166, 2001.

MELO, G.; SASSI, R.; ARAÚJO, T. F. H. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta) em água do mar enriquecida com soluções derivadas a decomposição de algas arribadas com meio de cultura. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 1, p. 45-53, 1993.

MENDES, M. C. Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 26, n. 3, p. 691-696, 2012.

MENDES, M. C.Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 26, n. 3, p. 691-696, 2012.

MENDES-CÂMARA, F. M.; MOURA, A. N.; VITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Ficoflórua planctônica do Rio Parnaíba, Estado do Piauí- Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 16, n. 1/2, p. 3-21, 2002.

MENDONÇA, I. T. L. **Variação espacial e temporal do microfitoplâncton e sua utilização no monitoramento da qualidade de água do Reservatório de Boa Esperança- PI/MA**. 2009. 65p. Dissertação (Mestrado em recursos pesqueiros e Aquicultura.) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

MENEZES, M.; BRANCO, S.; GUIMARÃES, R. R.; SOUSA, V. L. M.; ALVES-DE-SOUSA, C.; SILVA, W. J.; DOMINGOS, P.; GÔMARA, G. Composição florística de cianobactérias e microalgas do Canal do Piraquê, Lagoa Rodrigo de Freitas, sudeste do Brasil. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 3, p. 421-440, 2012.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 10-15, 2013.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1; p. 85-93, 2004.

MIZSEY, P., RACZ, L., Cleaner production alternatives: biomass utilization options. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, p. 767-770, 2010.

MOHANA S, ACHARYA BK AND MADAMWAR D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 12-25, 2009.

MOLINA GRIMMA, E.; BELARBI E.H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

MONTEIRO, F. M.; VASCONCELOS, J. F. **Ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas em um reservatório do semiárido brasileiro**. I Workshop Internacional Sobre Água no Semiárido Brasileiro. Campina Grande – PB. 2013.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 323-328, 2006.

MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; SANTOS, T. D.; CARVALHO, L. F.; COSTA, J. A. C. Análise sensorial: aceitação de gel energético adicionado de *Spirulina*. **Anais do 53º Congresso Brasileiro de Química**, 2013.

MORESCO, C.; BUENO, N. C. Scenedesmaceae (Chlorophyceae - Chlorococcales) de um lago artificial urbano: Desmodesmus e Scenedesmus. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 289, 2007.

MORRIS, I.; CLOVER, H. E. Questions on the mechanism of temperature adaptation in marine phytoplankton. **Marine Biology**, v. 24, p. 147-154, 1974.

MOURA, A. N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MENDONÇA, D. F. P.; OLIVEIRA, H. S. B.; DANTAS, Ê. W.; PIMENTEL, R. M. M. Microalgas e qualidade da água de manancial utilizado para abastecimento público localizado na região metropolitana da cidade do Recife, PE, Brasil. **Revista de Geografia**, v. 24, n. 2, p. 154-178, 2007.

MOURA, A. N.; DANTAS, E. W.; OLIVEIRA, H. S. B.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. 2011. Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.2, p.451-459, 2011.

NAKAGAWA, H.; GOMEZ-DIAZ, G. Usefulness of *Spirulina* sp. meal as feed additive for giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Suisanzoshuku**, v. 43, p. 521–526, 1975.

NAKANISHI, M.; MONSI, M. Effects of variation in salinity on photosynthesis of phytoplankton growing in estuaries. **Journal of the Faculty of Science University of Tokyo Section, III**, v. 9, n. 2, p. 19-42, 1965.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L.; SANTOS, J. N.; NASCIMENTO, T. P.; NASCIMENTO, M. A.; NETO, J. B. C.; SOUSA, C. S. Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: importância no cenário atual, principais entraves e resultados promissores na Bahia. **DIÁLOGOS & CIÊNCIA – Revista da Rede de Ensino FTC**, 2009.

NIMER, E. Clima. 1977. p.51-89. In: GOLDENBERG, C. **Geografia do Brasil. Região Sudeste**. IBGE, Rio de Janeiro, 1977.

NOGUEIRA, I. S. Botryococcaceae, Radiococcaceae e Oocystaceae (Chlorellales, Chlorophyta) do Município do Rio de Janeiro e arredores, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, n. 4, p. 677-696, 1996.

NUHU, A. *Spirulina (Arthrospira)*: An Important Source of Nutritional and Medicinal Compounds Abdulmumin. **Journal of Marine Biology**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

O'CALLAGHAN, M. C. Biotechnology in natural food colours: The role of bioprocessing. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural food colorants**. London: Blackil Academic Professional; 1996. p. 80-108

O'CONNOR, W. A.; NELL, J. A.; DIEMAR, J. A. The evaluation of twelve algal species as food for juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). **Aquaculture**, v.108, p. 277-283, 1992.

OJEDA, A.; ALFONSO, A. Estudio comparativo del crecimiento y composición química de três espécies fitoplantónicas utilizando cuatro fuentes de nitrógeno. **Informativo Técnico Instituto Español de Oceanografía**, v. 1, n. 45, p. 1-14, 1986.

OKAUCHI, M.; Y. HIRANO. Nutritional value of *Tetraselmis tetraele* for larvae of *Penaeus japonicus*. Bull. Natl. Res. Inst. **Aquaculture**, v. 9, p. 29-33, 1986.

OLIVEIRA, A. A.; KOENING, M. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, n. 3, p. 293-298, 1984.

OLIVEIRA, A. C. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. EM EFLUENTE DE BOVINOCULTURA BIODIGERIDO**. 2013, 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

OLIVEIRA, A. C. D. **Síntese enzimática do biodiesel de microalgas a partir de lipases produzidas por fungos endofíticos**. 2013. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) Universidade Federal do Paraná . Curitiba, 2013.

OLIVEIRA, H. T. de. Vinasse as substrate to culture *Chlorella vulgaris*. In: **Anais...**, International Workshop on Microalgae and Aquatic Plants Culturing, Habana, Cuba, 1995, 40 p.

OLIVEIRA, H. T.; CÁCERES, O. Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultivo para 8 espécies de algas de água doce. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v. 1, p. 601-610, 1986.

OLIVEIRA, **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP-211/11b)**. 1988. 146p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1895-1902, 2004.

OREN, A.; TINDALL, B. J. Nomenclature of the cyanophyta/cyanobacteria/cyanoprokaryotes under the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. **Algological Studies**, v. 117, p. 39–52, 2005.

PANDIAN, P.; RAVINDRAN, A. D. *Scenedesmus* as a potential source of biodiesel among selected microalgae. **Current Science**, v. 102, n. 4, 2012.

PANOSSO, R. F.; COSTA, I. A. S.; SOUZA, N. R.; ATTAYDE, J. L.; CUNHA, S. R. S.; GOMES, F. C. F. Cianobactérias e Cianotoxinas em reservatórios do Estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 433-449, 2007.

PANT, D., ADHOLEYA., A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2321-2334, 2007.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 35–42, 2011.

PASQUALI, L. **Psicometria: Teoria e aplicações**. A teoria clássica dos testes psicológicos. Brasília: Editora UnB, 1997.

PATHADE, G. R. A review of current technologies for distillery wastewater treatment. p. 180–239, 1999. In: GOEL, P. K. **Advances in Industrial Wastewater Treatment. Technoscience Publications**, Rajasthan, India, 1999.

PATIL, V.; KÄLLQVIST, T.; OLSEN, E.; VOGT, G.; GISLERD, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. **Aquaculture**, v. 15, p. 1-9, 2007.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.

PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L.; SALMAN ALROKAYAN, S.; FOUZI MOUFFOUK, F.; VARELA, ABU-SALAH, K. M.; BEN-HAMADOU, R. Isolation and fatty acid profile of selected microalgae strains from the Red Sea for biofuel production. **Energies**, v. 6, p. 2773–2783, 2013.

PESSOA, C. R. D.; FERREIRA-CORREIA, M. M.; CUNHA, M. G. G. S. Novas ocorrências de diatomáceas pennales para o Estado do Maranhão, Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 10, p. 65-77, 1997.

PINDICH, R. S.; RUBINFELD, D. **Econometric models and economic forecast**. New York: MacGraw-Hill, 1981.

PIRES, J. C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; MARTINS, F. G.; SIMOES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3043–3053, 2012.

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

POLONIO, N.; MEIRE, F.; MONTEIRO, C.; TAKEUCHI, K. P.; GODOY, D. E. D. Development of cassava cake enriched with its own bran and *Spirulina platensis*. **Acta Scientiarum Technology**, v. 34, n. 4, p. 465-472, 2012.

POULET, S. A.; MARTIN-JÉZÉQUL, V. Relationships between dissolved free amino acids. Chemical composition and growth of the marine diatom *Chaetoceros debile*. **Marine Biology**, v. 77, p. 93-10, 1983.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. p. 3-73.

PRASAD, C. S. Science and Technology in Civil Society Innovation Trajectory of *Spirulina* Algal Technology. **Economic and Political Weekly**, p. 4063- 3372, 2005.

PRASAD, R.; KUMAR, R.; SRIVASTAV, S. N. Design of Optimum Response Surface Experiments for Electro-Coagulation of Distillery Spent Wash. **Water Air Soil Pollut**, v. 191, p. 5-13, 2008.

PRATOOMYOT, J. P.; SRIVILAS; NOIRAKSAR T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 6, p. 1179 – 1187, 2005.

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

QUARMBY, L. M.; TURPIN, D. H.; HARRISON, P. J. Physiological responses of two marine diatoms to pulse additions of ammonium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 63, n. 2, p. 173-182, 1982.

QURAIISHI, F. O; SPENCER, C. P, Studies on the growth of some marine unicellular algae under different artificial light sources. **Marine Biology**, v. 8, n. 1, p. 60-65,1971.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n.7, p. 1609-1612, 2008.

RAIMBAULT, P. Effect of temperature on nitrite excretion by three marine diatoms during nitrate uptake. **Marine Biology**, v. 92, n. 2, p. 149-155, 1986.

RAIMBAULT, P. Influence of temperature on the transiente response in nitrate uptake and reduction by four marine diatoms. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 84, p.37-53, 1984.

RAJA, R.; HEIMASWARYA, R.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.

RAJANIEMI, P.; HROUZEK, P.; KATOVSKÁ, K.; WILLAME, R.;RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation ofthe genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 11-26, 2005.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. M.; GÓES-NETO, A.; MOURA, C. W. N. *Monoraphidium* and *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. **Hoehnea**, v. 39, n. 3, p. 421-434, 2012.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37. 2003.

RAMOS, G. J.P.; BICUDO, C. E. M.; GOES NETO, A.; MOURA, C. W. N. *Monoraphidium* and *Ankistrodesmus*(Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. **Hoehnea** [online], v. 39, n. 3, p. 421-434, 2012.

RANGEL, A. J.; NASCIMENTO, D. K. J.; OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, E. C. C.; LACERDA, S. R. Microalgas perifíticas em reservatório cearense: avaliação da qualidade da água. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, 2013.

RAS, M.; LARDON, L.; BRUNO, S.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 200-206, 2011.

RAWAT, I.; RANJITH, K.; KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3411-3424, 2011.

REIS, A. C. Clima da Caatinga. **Anais da academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p.325-335. 1976.

RIBEIRO, G. F.; ANDRADE, R. R.; MAIZONAVE, C. R. M.; CROSSETTI, L. O. Effects of cyanobacterial summer bloom on the phytoplankton structure in an urban shallow lake, Guaíba Lake, southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**. v.7, n.2, p.78-87, may - august 2012.

RICHMOND, A. Microalgaculture. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 4, p. 369-438, 1986.

RICHMOND, A. The challenge confronting industrial microalgaculture: high photosynthetic efficiency in large scale reactors. **Hydrobiologia**, v. 151/152, p. 117-121, 1987.

RICHMOND, A. *Spirulina*. 1988. p.85-121. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge U.P., 1988.

RICHMOND A. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: COHEN, Z. **Chemicals from Microalgae**. London: Taylor & Francis Ltd., 1999.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

RIEDGER, W . **Composição e estrutura da comunidade fitoplanctônica em Lagoas de Estabilização da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), Cascavel, Paraná, Brasil. Toledo –PR**. 2013. 41 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) Universidade estadual do Oeste do Paraná. 2013.

RIJSTENBIL, W. Selection of phytoplankton species in culture by gradual salinity changes. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 2, n. 3, p. 291-300, 1988.

RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 28-76, 1988.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODOLFI L.; ZITELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain selection: induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112. 2008.

RODRIGUES, J. B. R.; BELLI, P. F. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, v. 17, n. 2, p. 7-26, 2004.

RODRIGUES, L. L. R. **Biodiversidade de cianobactérias das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil**. 2008 205p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RODRIGUES, L. L.; SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A. Chlorophyceae das represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** [online], v. 33, n. 2, p. 247-264, 2010.

RODRIGUES, S. C. **Estudo comparativo da estrutura da comunidade fitoplanctônica na Foz dos rios formadores do Delta do Jacuí, rio Grande do Sul, Brasil**. 2004. 11p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

ROESSLER PG, BROWN LM, DUNAHAY TG, HEACOX DA, JARVIS EE, SCHNEIDER JC, ET AL. Genetic-engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. **ACS Symposium Series**, v. 566, p. 255–70, 1994.

ROSINI, E. F. **Fitoplâncton de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo: levantamento florístico**. 2010. 215 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.

ROSINI, E. F.; SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A. Cyanobacteria de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia** [online], v. 64, n. 2, p. 399-417, 2013a.

ROSINI, E. F.; SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A. Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: levantamento florístico. **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 661-678. 2013b.

TAIPALE, S.; STRANDBERG, U.; PELTOMAA, E.; GALLOWAY, A. W. E.; OJALA, A.; BRETT, M. T. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 71, p. 165–178, 2013.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciencia. 2006.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; SENNA, P. A. C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: *Chroococcales*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 213-227, 2004.

SANTOS, K. R. S.; SANT'ANNA, C. L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 1, p. 61-83, 2010.

SASSANO, C. E. N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo  $\gamma$ -linolênico da biomassa de *Spirulina platensis***. 1999. 144 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SASSI, P. G. P. **Cianobactérias marinhas dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. Cultivo, Taxonomia e Potencialidades de aplicações em biotecnologia**. 2013. 77p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SASSI, R. **Fitoplâncton da formação recifal da Ponta do Seixas (lat. 7°9'16''s, Long. 34°47'35''W), Estado da Paraíba, Brasil: composição, ciclo anual e alguns aspectos fisiológicos**. 1987. 163p. Tese (Doutorado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

SASSI, R.; KUTNER, M. B. B. ; MOURA, G. F. Studies on the decomposition of drift from the northeast Brazilian coastal reefs. **Hydrobiologia**, v. 157, p. 187-192, 1988.

SASSI, R.; MOURA, G. F. Nutrient limiting phytoplankton growth from coastal reefs off northeast Brazil. In: **Encontro Brasileiro de Plâncton**, 3. Memórias. Caiobá (PR), 1988. p. 57-62.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Removal of color from biomethanated distillery spent wash by treatment with activated carbons. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2629-2635, 2007.

SAUODIS-HELIS, L.; DUBACQ, J. P.; MARTY, Y.; SAMAIN, J. F.; GUDIN C. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone T. isso. **Journal Applied to Phycology**, v. 6, p. 315–322, 1999.

SAVIDGE, G. Growth and photosynthetic rates of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin in a cyclical light field. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.100, n.1-3, p. 147-164, 1986.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE; YOKOYAMA Y. S.-Y. CO<sub>2</sub> fixation and oil production through microalga. **Energy Conversion and Management**, v. 36, p. 729–731, 1995.

SCHOBERT, C. L. Proline catabolism, relaxation of osmotic strain and membrane permeability in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Physiologia Plantarum**, v. 50, p. 37-42, 1980.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. 1978. Effects of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture**, v. 14, n. 3, p. 247-260, 1978.

SEBASTIEN, N. Y.; KLEIN, V. L. M. Efeito do meio Erd Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 149-152, 2006.

SHAH, G.; SYRETT, P. J. Uptake of guanine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Phycology**, v. 15, n. 4, p. 353-362, 1982.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae**. Department of Energy's, Office of Fuels development. Colorado, 1998. 328 p.

SHIMIZU, Y. Microalgae as a drug source. p. 30–45, 2000. In: FUSETANI, N. **Drugs from Sea**, 2000.

SHIMURA, S.; SHIBUYA, H.; ICHIMURA, S. Growth and photosynthesis properties of some planktonic marine diatoms at various salinity regimes. **Mer, Tokyo**, v. 17, p.149-155, 1979.

SIGAUD, R.C.S. **Efeitos de temperatura e salinidade sobre as respostas de crescimento e o conteúdo de clorofila-a de algumas espécies de algas planctônicas, em cultura**. 1990. 352 p. Dissertação - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

SILVA, C. A.; TRAIN, S.; RODRIGUES, L. C. Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica a jusante e montante do reservatório de Corumbá, Caldas Novas, Estado de Goiás, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 23, p. 283-290, 2001.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA JÚNIOR; P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2007.

SILVA, I. G.; MOURA, A. N.; DANTAS, E. W. Phytoplankton community of Reis lake in the Brazilian Amazon. **Anais... Academia Brasileira de Ciências**, vol. 85, núm. 2, abril-junio, 2013, pp. 649-663

SILVA, M. H. **Estrutura e produtividade da comunidade fitoplanctônica de um estuário tropical (Sirinhaém, Pernambuco, Brasil)**. 2009. 170 p. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SIMON, C. M. The culture of the diatom *Cheatoceros gracilis* and its use as food for penaeid protozoal larvae. **Aquaculture**, v.14, n. 2, p. 105-113, 1978.

SIMPORE, J.; KABORE, F.; ZONGO, F. Nutrition Rehabilitation of Undernourished Children Utilizing Spiruline and Misola. **Nutrition Journal**, v. 5, p. 3, 2006.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – algas clorofíceas. **Biotemas**, v. 6, n. 1, p. 93-106, 1993.

SKJÅNES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. BioCO<sub>2</sub> – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 405-413, 2007.

SOTIROUDIS, T. G.; SOTIROUDIS, G. T. Health aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*) microalga food supplement. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, n. 3, p. 395 – 405, 2013.

SOUTHGATE, P.; BEER, A. C.; DUNCAN, P. F.; TAMBURRI, R. Assessment of nutritional value of three species of tropical microalgae, dried *Tetraselmis* and a yeastbased diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pincta margaritifera* (L.). **Aquaculture**, v. 162, p. 247-257, 1998.

SOUZA, B. D. **Estrutura, dinâmica e produtividade primária do fitoplâncton como base para estimativa do estado trófico de uma lagoa costeira no estado do Espírito Santo (lagoa Mãe-Bá, Guarapari)**. 2008. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, 2008.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STAINER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The Cyanobacteria. **Annual Review of microbiology**, v. 31, p. 225-74, 1977.

STANIER, R. Y., SISTROM, W. R., HANSEN, T. A. 9 other authors. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, p. 335–336, 1978.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, v. 35, p. 171-205, 1971.

STONE, H.; SIDEL, J. The role of sensory evaluation in the industry. **Food Quality and Preference**, v.4, n. 2, p. 65-73, 1993.

STONE, H.; SIDEL, J. The role of sensory evaluation in the industry. **Food Quality and Preference**, v. 4, n. 2, p. 65-73, 1993.

STOTT, A. E.; TAKEUCHI, T.; KOIKE, Y. Performance of a new artificial abalone hatchery culture system in terms of settlement of larvae and growth and survival of post-larvae *Haliotis discus* (Reeve). **Fisheries Science**, v. 70, p. 1070–1081, 2004.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SUKENIK, A.; YAMAGUCHI, Y.; LIVNE, A. Alteration in lipid molecular species of marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. **Journal of Phycology**, v. 29, p. 620-626, 1993.

SZYMANSKI M. S. E., BALBINOT R., SCHIRMER W. N. Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 901-912, 2010

REZANKA, T.; DOR, I.; PRELL, A.; DEMBITSKY, V. M. Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. **Folia Microbiologica**, v. 48, p. 71–75, 2003.

TABERNERO, A., MARTÍN DEL VALLE, E. M., GALÁN, M. A. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: scale-up and economics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 104–115, 2012.

TALAMONI, J. L. B.; SILVA, F. H.; CÁCERES, O. Composição primária dos polissacarídeos de *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin (Cyanophyceae). In: **Resumos do Encontro Brasileiro de Plâncton**, p. 31, 1988.

TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Anais... I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, DF. 2006.

TEIXEIRA, C.; VIEIRA, A. A. H. Nutrient experimente using *Phaeodactylum tricorutum* as na assay organismo. **Boletim do Instituto de Oceanografia**, v. 25, p. 29-42, 1976.

TEIXEIRA, E. MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: Editora da UFRS, 1987. 180p.

TEIXEIRA, M. B.; COURA NETO, A. B.; PASTORE, U.; RANGEL FILHO A. L. R. Vegetação. In: **Levantamento de recursos naturais**. IBGE, Rio de Janeiro, v. 33, p. 541-632, 1986.

THAKUR, C.; SRIVASTAVA, V.; MALL, I. Electrochemical treatment of a distillery wastewater: Parametric and residue disposal study. **Chemical Engineering Journal**. V. 148, n. 2-3, p. 496-505, 2009.

The CAUP Image database. Disponível em <<http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/1226>> Acesso em:10 de abril de 2014 às 10hrs.

THOMPSON, G.A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1302, p. 17-45, 1996.

THOMPSON, S. C. G.; BARTON, M. A. Ecocentric and anthropocentric attitudes toward the environment. **Journal of Environmental Psychology**, v. 14, p.149-157, 1994.

TONDEE, T.; SIRIANUNTAPIBOON, S. Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6258-6265, 2008.

TONIETTO, A. E.; LOMBARDI, A. T.; HENRIQUES V.; ARMANDO A.; PARRISH, C. C.; CHOUERI, R. B. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) exudates: Chemical characterization and complexation capacity for Cu, Zn, Cd and Pb. **Water Research**, v. 49, p. 381-390, 2014.

TORGAN, Lezilda Carvalho and HENTSCHKE, Guilherme Scotta. Estrutura da comunidade de Chlorococcales *sensu lato* (Chlorophyceae) em diferentes habitats aquáticos e hidroperíodos. **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 25, n. 1, p. 83-94, 2011.

USUI, N.; IKENOUCI, M. The biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by RITE (1): Highly-effective photobioreactor system. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 487-492, 1997.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. **Water Research**, v. 36, p. 4185-4192, 2002.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention. **Biologica Research** [online], v. 36, n. 3-4, p. 291-302, 2003.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN, N R.; NÚÑEZ, C. F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 207 – 216, 2002.

VAN BEILEN, J. B. Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 41-52, 2010.

VANDERLEI, S. L. P. **Fases de equilíbrio de cianobactérias em reservatório eutrófico do semiárido durante período de estiagem prolongada**. 2013. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2013.

VASCONCELOS, J. F.; Barbosa, J. E. L.; Diniz, C. R.; Ceballos, B. S.O. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores. **Boletim Ablimno**, v. 39, n. 2, 2011.

VENKATARAMAN, L. V.; SOMASEKARAN, T.; BECKER, E. W. Replacement value of blue-green alga (*Spirulina platensis*) for fish meal and a vitamin-mineral premix for broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 3, p. 373-381, 1994.

VIDAL, W. C. L.; SASSI, R. Influência do Manguezal na Região Marinha Adjacente à Laguna de Jacarapé, João Pessoa, Paraíba, Brasil. In: SILVA, M. J. L. **Iniciados**. 4ed. João Pessoa, p. 89-107, 1998.

VIEIRA, A. A. H. **Estudos experimentais em fitoplâncton marinho. Culturas e aspectos ecofisiológicos**. 1975. 106 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.

VIEIRA, A. A. H. **Excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplanctônicas marinhas**. 1980. 121 p. Tese (Doutorado em Oceanografia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

VIEIRA, A.; TUNDISI, J. G. Notas sobre o cultivo de algumas espécies de algas de água doce. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 39, n. 3, p. 703-706, 1979.

VÍLCHEZ, C.; GARBAYO, I.; LOBATO, M. V.; VEJA, J. M. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 20, v. 8, p. 562-572, 1997.

VILCHEZ, C., VEGA, J.M. Nitrite uptake by *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized in calcium alginate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 137–141, 1994.

VILLAMIZAR, G. S. M. **Caracterização de carotenóides e lipídeos de microalgas in-vivo utilizando espectroscopia Raman**. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

VON SHACKC, C. Omega-3 fatty acids: antiarrhythmic, proarrhythmic or both? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, p. 9-94, 2008.

VON SHACKC, C.; HARRIS, W. S. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 310 – 315, 2007.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). In: **Physiology, Cell Biology and Biotechnology**. London: Taylor & Francis. 1997.

VONSHAK, A.; GUY, R.; GUY, M. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 417–420, 1988.

WALNE, P. R. Studies on the food values of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. **Fishery investigations, series II**, v.26, n. 5, p. 62, 1970.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C.Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008.

WARD. O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3627-3652, 2005.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoid acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 218-224, 2000.

WHYTE, J. N. C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalve. **Aquaculture**, v. 60, p.231-241, 1987.

WIKFORS, G. H. altering growth and Gross chemical composition of two microalgal mulluscan food species by varying nitrate and phosphate. **Aquaculture**, v. 59, p. 1-14, 1986.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>o</sup> ed., v. 1, p. 487–493. New York: Springer, 2001.

WEN, Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 218, 2000.

YANG, H. N.; LEE, E. H.; KIM, H. M. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. **Life Sciences**, v. 61, n. 13, p. 1237 - 1244, 1997.

YONESHIGUE-BRAGA, Y. Flora marinha bentônica da baía de Guanabara e cercanias. III. Rhodophyta, 1. Goniotrichales, Bangiales, Compsopogonales, Nemaionales, Gelidiales. **Instituto de Pesquisa Marinha**, v. 55, n. 1, p. 36, 1971.

YUNES, J.S.; CUNHA, N.T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. **Comments on Toxicology**, v. 9, p. 103-115, 2003.

YUSOFF, F. M.; MATIAS, H. B.; KHALID, Z. A.; PHANG, S. M. Culture of microalgae using interstitial water extracted from shrimp pond bottom sediments. **Aquaculture**, v. 201, p. 263-270, 2001

ZARROUK, C. **Contribution l'étude d'une cyanophyce** : influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. 1966. Thesis (PhD) – Faculty of Science, University of Paris. France, 1966.

ZAYAS, T.; RÓMERO, V.; SALGADO, L.; MERAZ, M.; MORALES, U. Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p. 270-276, 2007.

ZEENAT, R.; SHARMA, V. K.; RIZVI, Z. Synergistic effect of cyanobacteria and DAP on tomato yield. **Science & Culture**, v. 56, p. 129–131, 1990.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 539-554, 2003.

**APÊNDICES**

**APÊNDICE A - Ficha de avaliação do Teste de Aceitação e Intenção de Compra**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA - CCEN  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E MEIO  
AMBIENTE – PRODEMA**

**Teste de Aceitação e Intenção de Compra**

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_  
Ocupação \_\_\_\_\_ Gênero: \_\_\_\_\_

Você esta recebendo uma amostra de *Spirulina* em suas formas “in natura”, seca e alimento caseiro enriquecido com *Spirulina*. Avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada um dos atributos sensoriais listados, dando nota de acordo com a escala abaixo.

- 9) Gostei muitíssimo
- 8) Gostei muito
- 7) Gostei moderadamente
- 6) Gostei ligeiramente
- 5) Nem gostei/ Nem desgostei
- 4) Desgostei ligeiramente
- 3) Desgostei moderadamente
- 2) Desgostei muito
- 1) Desgostei muitíssimo

<b>Atributos</b>	<i>Spirulina</i> “in natura”	<i>Spirulina</i> seca	<b>Alimento</b> com <i>Spirulina</i>
<b>Aparência</b>			
<b>Odor</b>			
<b>Textura</b>			
<b>Avaliação Global</b>			

Indique sua atitude ao encontrar este produto no mercado

- 5) Compraria
- 4) Possivelmente compraria
- 3) Talvez comprasse / talvez não comprasse
- 2) Possivelmente não compraria
- 1) Não compraria

*Obrigada!*

## APÊNDICE B – Ficha do teste de Avaliação de Atitude Inovadora e Conservadora

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PPG EM DESENVOLVIMENTO E MEIO AMBIENTE - PRODEMA**

### AVALIAÇÃO DE ATITUDE INOVADORA E CONSERVADORA

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
 Ocupação: \_\_\_\_\_ Gênero: \_\_\_\_\_

Favor marcar sua atitude as perguntas dos questionamentos com base na escala abaixo:

- 1 – Concordo totalmente  
 2 – Concordo parcialmente  
 3 – Nem concordo nem discordo  
 4 – Discordo parcialmente  
 5 – Discordo totalmente

1. Necessitamos conservar as nossas tradições de sertanejo para assegurar uma vida de alta qualidade. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
2. Alimento saudável é aquele que podemos comprar todos os dias. Ter dinheiro faz a diferença pois dinheiro e comida geram bem estar. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
3. O que me inquieta mais é pensar que um dia poderá faltar carne de boi ou de bode, e leite e milho para o e feijão para o sertanejo. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
4. Gostaria de ver mais espaços da caatinga sendo ocupados com criação de bois ou bodes e outras atividades agrícolas.. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
5. O governo deveria investir mais no nordeste para fomentar essas coisas que já são tradição. Não precisamos do novo. A caatinga dá de tudo. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
6. Eu não acho que o problema o desmatamento da caatinga é tão grave como o povo fala. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
7. Eu não me preocupo com problemas da natureza, pois com o tempo a maioria dos problemas ambientais se resolverão por si mesmos. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
8. Tudo que se diz sobre as dificuldades do sertanejo é exagerado. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5.
9. Angustia-me ver que poderá faltar alimento para a humanidade e que a miséria poderá se amplificar, mas não acho que isso tem a ver com as dificuldades que passamos no sertão. ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
10. A utilização intensiva de água em irrigação agrícola, como é comum em muitas propriedades rurais é fato que não me preocupa, pois sempre é possível conviver com a seca ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
11. Sinto-me feliz em poder colaborar com projetos que trazem inovação, como o cultivo artesanal de *Spirulina*, pois certamente trará muitos benefícios ao sertanejo.  
 1ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5    2ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
12. Existem momentos em que precisamos pensar em coisas novas. Isso me parece ser o caso da *Spirulina*.  
 1ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5    2ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
13. Certamente a *Spirulina* pode ser útil para alimentação humana e de animais e para outras finalidades, e assim seu cultivo deve ser estimulado entre os sertanejos.  
 1ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5    2ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
14. Uma das razões mais importantes pelas quais devemos cultivar *Spirulina* é porque ela também pode ajudar a melhorar a renda do pequeno agricultor.  
 1ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5    2ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5
15. Uma das razões importantes para incorporar *Spirulina* na alimentação diária é assegurar uma melhor qualidade de vida. 1ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5    2ª ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5

**Obrigada!**



**ANEXOS**

## ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a),

Esta pesquisa é sobre Aceitação e avaliação de atitude inovadora e conservadora dos agricultores do semiárido brasileiro perante o cultivo e consumo de *Spirulina* e está sendo realizada por Jordana Kaline da Silva Santana aluna do curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Sassi e Co-Orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Ilda Antonieta Salata Toscano.

O objetivo do estudo são medir o nível de aceitabilidade da incorporação de biomassa de espécies produtoras de proteínas e ácidos graxos na alimentação humana ou em ração animal.

A finalidade deste trabalho é contribuir para elaboração de alimento enriquecido com *Spirulina*, devido ao seu potencial proteico, presença de ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos, minerais e vitaminas, tornando-se mais uma alternativa alimentar, promovendo benefícios à saúde do consumido. E avaliar a abertura para cultivo de novas culturas.

Solicitamos a sua colaboração para participar da análise sensorial de alimento caseiro (bolo, sucos, sorvetes) enriquecido com *Spirulina* e responder a um questionário, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos nas áreas de nutrição, meio ambiente e biotecnologia e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

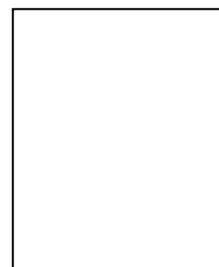
Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento

---

Assinatura do Participante da Pesquisa  
ou Responsável Legal

---

Assinatura da Testemunha



Espaço para impressão datiloscópica

Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) pesquisador (a) Jordana Kaline da Silva Santana

Endereço (Setor de Trabalho): Laboratório de Estudos Ambientais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) – Cidade Universitária / Campus I – CCEN - João Pessoa, PB  
Telefone: (083)9803-9515/ 8731-6044

Ou

Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB – Cidade Universitária / Campus I - Bloco Arnaldo Tavares, sala 812 – Fone: (83) 3216-7791

Atenciosamente,

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

---

Assinatura do Pesquisador Participante

## ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 7ª Reunião realizada no dia 24/07/2014, o Projeto de pesquisa intitulado: **“USO DE MICROALGAS COMO ALTERNATIVA ENERGÉTICA E ALIMENTAR NO ESTADO DA PARAÍBA”** da Pesquisadora Jordana Kaline da Silva Santana. Protocolo 095/14. CAAE: 27984414.1.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.

  
Drª Anne Margarete D. Rosa  
Coordenadora CEP/CCS/UFPB  
Mat. SIAPE: 0332618