



LUCAS AMBROSANO

**EFEITO DO ESTRESSE NA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DE MICROALGAS E DO EXTRATO
NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE**

LAVRAS - MG

2015

LUCAS AMBROSANO

**EFEITO DO ESTRESSE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
MICROALGAS E DO EXTRATO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES
DE ALFACE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ambrosano, Lucas.

Efeito do estresse na composição química de microalgas e do extrato na germinação de sementes de alface / Lucas Ambrosano. –
Lavras: UFLA, 2015.

108 p. : il.

Tese (doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. Microalgas. 2. Bioprodutos. 3. Águas Residuais. 4.
Sementes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LUCAS AMBROSANO

**EFEITO DO ESTRESSE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
MICROALGAS E DO EXTRATO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES
DE ALFACE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dr. Rafael Silva Menezes	MCTI
Dr. Élberis Pereira Botrel	UFLA
Dra. Luisa Maria Rodrigues Gouveia da Silva	LNEG
Dr. Pedro Castro Neto	UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

LAVRAS – MG
2015

Aos meus orientadores, Antônio Carlos Fraga e Pedro Castro Neto, que me acolheram como um filho e tornaram-se grandes amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre guiando meus passos.

Aos meus pais, por estarem ao meu lado apoiando-me e tentando sempre me oferecer o melhor para tornar minha vida sempre mais feliz e pelo amor concedido.

À minha família, por estar me apoiando em todos os momentos.

À Thalita, pela compreensão, carinho e amor dedicados, obrigado pelos momentos de apoio, incentivo e muita força para superar todas as dificuldades enfrentadas ao longo dessa jornada.

À família da Thalita que se tornou uma segunda família, agradeço ao apoio e acolhimento durante esse tempo.

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado nos momentos de alegria, de tristeza, de raiva, de conquistas, de decepção, em todos os momentos de minha vida acadêmica.

Aos amigos feitos em Lisboa, que me acolheram com todo carinho e foram fundamentais para o sucesso em minha estadia durante o Doutorado Sanduiche.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de estar estudando em uma das melhores Universidades do país, oferecendo-me toda a estrutura e ensinamentos para formar um profissional de qualidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, professores e funcionários, em especial, à secretaria do programa Marli dos Santos, por fazerem parte de minha formação.

Ao Laboratório Nacional de Energia e Geologia, pela oportunidade de realizar parte de minha formação em sua estrutura.

Aos meus orientadores, professor Élberis e prof. Renato Mendes por todo o apoio durante a execução deste trabalho; obrigado pela orientação durante essa etapa.

Aos professores Fraga e Pedrão, por todo o apoio, companheirismo, amizade e confiança, atuando não só como orientadores, mas em muitos casos, como pais, sempre buscando oferecer as melhores oportunidades.

À professora Luísa Gouveia, pela amizade e carinho em que me acolheu e pelos ensinamentos e orientações durante o período em que estive em Lisboa.

Às professoras Ana Paula, Belina, Cristina, Isabel Paula, Maria João, Paula Marques e Paula Passarinho, e aos professores Alberto, Luís e Santino, pelos ensinamentos e paciência no período de convívio no LNEG.

Às amigas, Graça e Natércia, em nome das quais agradeço a todos técnicos do LNEG.

Às amigas, Catarina Viegas e Sofia Graça, pelo companheirismo no desenvolvimento das atividades experimentais.

Aos amigos do grupo de estudos G-Óleo, pelo auxílio em todas as atividades durante a execução deste trabalho.

Ao senhor Rafael Silva Menezes, coordenador da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, pelo apoio e incentivo aos trabalhos realizados na cadeia produtiva do biodiesel.

A Capes, pelo apoio e bolsa concedida durante o período do curso e também pelo financiamento do processo 99999.012781/2013-04, programa Doutorado Sanduiche (PDSE/CAPES).

Às agências de fomento CNPq, Fapemig e Finep, pelo financiamento de projetos e estruturas utilizadas.

Ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, pelo apoio à pesquisa e incentivo a trabalhos inovadores.

RESUMO

As microalgas são um grupo de organismos aquáticos que podem apresentar grande potencial de cultivo devido à elevada taxa de crescimento. Várias espécies são cultivadas comercialmente em diversos países e a biomassa produzida tem sido utilizada em variadas aplicações, tais como, produtos para aplicação na indústria de alimentos, na produção de corantes naturais, como fonte de lipídeos, na produção de biocombustíveis (bioetanol e biodiesel) e na produção de bioprodutos para aplicação no cultivo vegetal. Uma maneira economicamente viável de produzir microalga pode ser utilizando águas residuais como meio de cultivo. No presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito do estresse na variação bioquímica das biomassas microalgais cultivadas em águas residuais e estudar o potencial de extratos produzidos com biomassa microalgal na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Foram testadas três microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e um Consórcio (Cons C) de microalgas isolado do próprio efluente urbano de Figueira da Foz/Portugal, foram cultivadas em condições normais. Depois disso, elas foram cultivadas com carência de nutrientes visando estressar as microalgas (St).. Fez-se a caracterização bioquímica das biomassas, por meio da quantificação dos sólidos voláteis, sólidos totais, umidade, cinzas, proteínas, açúcares, óleo e pigmentos totais. Foram preparados posteriormente extratos aquosos e metanólicos em três concentrações (2, 10 e 20 g L⁻¹) das microalgas Cv, Sc e Cons. C. Os extratos foram aplicados em sementes de alface. Foi avaliado a germinação no terceiro dia, germinação total, o índice de velocidade de germinação (IVG), tamanho de radícula, tamanho de hipocótilo, matéria seca por planta e matéria seca total (MS). As biomassas apresentaram variação na caracterização bioquímica, quando a biomassa é submetida a condições de estresse no cultivo. O perfil dos ácidos graxos das microalgas apresentam maiores teores de ácidos graxos insaturados, exceto para Sc que apresenta maior teor de ácido graxo saturado. A aplicação dos extratos aquosos de Cv, Sc, CvSt, ScSt e Cons C St apresentam efeito inibitório quando avaliado parâmetro IVG. E tem efeito estimulante em crescimento de radícula para os extratos da microalga Cons C e Cons C St. Todos os extratos metanólicos apresentam efeito inibitório do IVG, da germinação final e germinação do terceiro dia. O aumento da concentração do extrato metanólico diminui os valores de germinação final. O aumento da concentração do extrato metanólico de Cv diminui o teor de matéria seca por planta.

Palavras-chave: Bioprodutos. Microalgas. Extratos. Águas residuais.

ABSTRACT

Microalgae are a group of aquatic organisms that might have great potential for cultivation due to the high growth rate. Many species are grown commercially in several countries and the produced biomass has been used as a source in the food industry, in the production of natural dyes, as a source of lipids in the production of biofuels (bioethanol and biodiesel) and in the production of bioproducts for using in plant cultivation. An economically viable way of producing microalgae can be using wastewater as culture medium. The present work aimed to evaluate the effect of stress on biochemical variation of microalgal biomass grown in wastewater and, study the potential of extracts produced by microalgal biomass in the lettuce seed germination. Three microalgae, *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) and a Consortium (Cons C) of isolated microalgae extracted of urban effluent of Figueira da Foz / Portugal, were used. The microalgae were grown under normal conditions. Thereafter, to stress the microalgae, they were placed in solution without nutrients. The biochemical characterization of biomass was made through analysis of the volatile solids, total solids, moisture, ash, protein, sugar, oil and total pigments. Later, aqueous and methanolic extracts in three concentrations (2, 10 and 20 g L⁻¹) of microalgae Cv, Sc and Cons. C were prepared. The extracts were applied in lettuce seeds. The germination on the third day, total germination, the speed of germination index (SGI), root size, hypocotyl size, dry matter per plant and total dry matter (DM) were measured. The biomass showed variation in biochemical characterization, when the biomass is subjected to stress conditions in cultivation. The profile of fatty acids from microalgae has higher levels of unsaturated fatty acids, except for Sc that has a higher saturated fatty acid content. The application of aqueous extracts of Cv, Sc, CvSt, SCST and Cons C St exhibit inhibitory effect when the SGI was evaluated. A stimulating effect on radicle growth of microalgae extracts for Cons C and C Cons St was observed. All the methanolic extracts have inhibitory effect on germination on the third day, total germination and SGI. Increasing the concentration of the methanol extract decreases the final germination values. Increasing the concentration of the methanol extract Cv decreases the content of dry matter per plant.

Keywords: Bioproducts. Microalgae. Extracts. Wastewaters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotobiorreator fechado (PBR) tubular vertical	38
Figura 2	Esquema simplificado do Fotobiorreator de 150L	39
Gráfico 1	Caracterização bioquímica da biomassa da espécie <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv) e <i>Chlorella vulgaris</i> estressada (CvSt)	46
Gráfico 2	Caracterização bioquímica da biomassa da espécie <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e <i>Scenedesmus obliquus</i> estressada (ScSt)	49
Gráfico 3	Caracterização bioquímica da biomassa do Consórcio C. (Cons. C) e do Consórcio C. estressado (Cons. C St)	51
Gráfico 4	Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.....	56
Gráfico 5	Resultados de germinação final (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	59
Gráfico 6	Resultados de germinação ao terceiro dia (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	63

Gráfico 7	Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	65
Gráfico 8	Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	68
Gráfico 9	Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse. e sem estresse	71
Gráfico 10	Resultados de matéria seca total por planta (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	73
Gráfico 11	Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	76
Gráfico 12	Resultados de germinação final (%) nas diferentes concentrações de extrato metanólico (2,10 e 20 g/L)	79

Gráfico 13	Resultados de germinação final (%) na aplicação de extratos metanólico de microalgas, <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C e o tratamento controle	79
Gráfico 14	Resultados de germinação ao terceiro dia (%) na aplicação de extratos metanólico de microalgas, <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C e o tratamento controle	82
Gráfico 15	Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	84
Gráfico 16	Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	87
Gráfico 17	Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	90
Gráfico 18	Resultados de matéria seca por plantula (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais vantagens em sistemas de cultivo aberto e fotobiorreatores fechados	27
Tabela 2	Ácidos graxos presentes nos extratos de óleo de <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consórcio C (Cons. C)	52
Tabela 3	Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de biomassa das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C, submetidas a condições com (St) e sem estresse	56
Tabela 4	Resultados de germinação final (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	59
Tabela 5	Resultados de germinação ao terceiro dia (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	63
Tabela 6	Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	65

Tabela 7	Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	68
Tabela 8	Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	71
Tabela 9	Resultados de matéria seca por planta (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	73
Tabela 10	Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	76
Tabela 11	Resultados de germinação final (%) na aplicação de extratos metanólicos das espécies <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consórcio C (Cons. C) em cultivos com (St) e sem estresse	78

Tabela 12	Resultados de germinação ao terceiro dia (%) na aplicação de extratos metanólicos das espécies <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consórcio C (Cons. C) em cultivos com e sem estresse	81
Tabela 13	Resultados de germinação ao terceiro dia (%) na aplicação de extratos metanólicos das espécies <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consórcio C (Cons. C) nas concentrações de 2, 10 e 20 g/L	82
Tabela 14	Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	84
Tabela 15	Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	87
Tabela 16	Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	90
Tabela 17	Resultados de matéria seca por plantula (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse	92

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEORICO	20
2.1	Microalgas	20
2.2	Tipo de cultivo	25
2.3	Sistemas de cultivo	26
2.4	Aplicações das microalgas	28
2.5	Germinação de sementes	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Local e período	37
3.2	Cultivo das microalgas	38
3.3	Caracterização da biomassa microalgal	40
3.4	Preparação dos extratos das microalgas	43
3.5	Aplicação dos extratos na germinação de sementes	43
3.6	Estatística	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Caracterização da biomassa	45
4.1.1	<i>Chlorella vulgaris</i> (Cv)	45
4.1.2	<i>Scenedesmus obliquus</i> (Sc)	48
4.1.3	Consortio C. (Cons. C)	50
4.1.4	Perfil ácidos graxos	52
4.2	Aplicação de extratos de microalgas	54
4.2.1	Extrato aquoso	54
4.2.1.1	Índice de velocidade de germinação – IVG (%)	55
4.2.1.2	Germinação final (%)	58
4.2.1.3	Germinação ao terceiro dia (%)	61
4.2.1.4	Tamanho de radícula (cm)	64
4.2.1.5	Tamanho de hipocótilo (cm)	67

4.2.1.6	Matéria seca total (mg)	69
4.2.1.7	Matéria seca por planta (mg)	72
4.2.2	Extrato metanólico	74
4.2.2.1	Índice de velocidade de germinação – IVG (%)	75
4.2.2.2	Germinação final (%)	78
4.2.2.3	Germinação ao terceiro dia (%)	80
4.2.2.4	Tamanho de radícula (cm)	83
4.2.2.5	Tamanho de hipocótilo (cm)	86
4.2.2.6	Matéria seca total (mg)	88
4.2.2.7	Matéria seca por planta (mg)	91
5	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO	108

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são um grupo de organismos unicelulares, normalmente autotróficos, podendo ser procariotos ou eucariotos. Por serem fotossintéticos permitem a conversão de energia solar em química. São seres aquáticos que podem crescer em águas marinhas ou em água doce e apresentam grande potencial devido à elevada taxa de crescimento. A quantidade exata de espécies microalgais não é conhecida, existe na literatura relatos de que podem ser encontradas alguns milhares de espécies. Essa grande quantidade de espécies propicia uma diversificação da composição bioquímica das biomassas microalgais, possibilitando uma gama enorme de produtos a serem obtidos das microalgas (PULZ; GROSS, 2004).

A escolha da espécie a ser cultivada deve levar em consideração a aplicação que se pretende dar, pois a composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie algal e de fatores ambientais, tais como, a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e concentração de CO₂.

O cultivo de microalgas pode apresentar inúmeras vantagens, como, alta taxa de acúmulo de biomassa, elevada eficiência fotossintética, consumo de CO₂ atmosférico e produção de O₂, uso de menores áreas quando comparadas com o cultivo agrícola, utilização de terras inférteis e a utilização de águas não potáveis. Uma das principais vantagens da produção de microalgas é a possibilidade de seu cultivo em águas não potáveis, especificamente, águas salobras, águas residuárias de esgoto e águas residuárias de diversas outras atividades, o que cria um cultivo que não necessita de água potável, um bem tão valioso na sociedade. Outro ponto a ser destacado é o uso de áreas inférteis, o que nos oferece alternativa na produção de energia que não irá competir com culturas alimentícias produzidas em áreas férteis.

A biomassa de algumas espécies de microalgas produzidas comercialmente tem sido utilizada em variadas aplicações, tais como, produtos para aplicação na indústria de alimentos, produção de corantes naturais, fonte de lipídeos, produção de biocombustíveis (bioetanol e biodiesel) e a produção de bioprodutos para aplicação no cultivo vegetal.

Uma das grandes vantagens na produção de lipídeos a partir da biomassa microalgal em comparação as culturas energéticas oleaginosas é o tempo para produção, que pode durar de meses a anos, enquanto que as microalgas podem começar em 5 dias, podendo a biomassa ser recolhida diariamente. Estes organismos podem ser produzidos ao longo de todo o ano, ao contrário da maior parte das culturas que são sazonais.

Atualmente o processo autotrófico é a técnica mais viável economicamente de cultivo de microalgas em escala comercial, e comumente é conduzido em ambiente exterior com luz solar abundante (LAM; LEE, 2012). Uma das formas economicamente viável de obter biomassa algal para produção de biocombustíveis em larga escala, minimizando os impactos ambientais, é a utilização das microalgas para o tratamento de águas residuais (ABDELAZIZ; LEITE; HALLENBECK, 2013; PARK; CRAGGS; SHILTON, 2011; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

As microalgas cultivadas em águas residuárias aliadas a fontes geradoras de CO₂ poluente, podem se tornar um complexo de produção de energia e bioprodutos. Cultivo este com diversas vantagens ao meio ambiente, visto que se trata da produção de energia limpa, tratamento de água residual e purificação do CO₂ que seria emitido à atmosfera.

A produção de bioprodutos a partir da biomassa microalgal pode tornar-se uma alternativa interessante na construção de um cultivo mais viável de microalgas em escala comercial. Alguns desses bioprodutos têm grande potencial de uso na nutrição vegetal, como bioestimulantes de germinação de

sementes, enraizamento e alongamento de plantulas e desenvolvimento de plantas. Diante disto, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do estresse na variação bioquímica das biomassas microalgais cultivadas em águas residuais e estudar o potencial de extratos produzidos com biomassa microalgal na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*).

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Microalgas

As microalgas representam um sistema mais simples do que as plantas, são predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos (5 - 300 µm) unicelulares, podendo formar colônias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular. Sua coloração variada é característica devido à presença de pigmentos e mecanismo fotoautotrófico em sua estrutura. Filogeneticamente, o grupo das microalgas é composto de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As microalgas possuem uma composição bioquímica diversificada composta por: proteínas, carboidratos, ácidos graxos, carotenóides, dentre outros. A composição bioquímica está diretamente relacionada à natureza de cada espécie, aos fatores ambientais relacionados ao local de cultivo e ao meio de cultura utilizado para seu desenvolvimento (MIAO; WU, 2006; ZAMALLOA et al., 2011).

Até poucos anos, em ficologia aplicada o termo microalga referia-se às algas microscópicas e as cianobactérias (TOMASELLI, 2004). Assim, “microalgas” representavam tanto organismos eucarióticos, como as algas verdes (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*), quanto procarióticos

como as *Cyanophyceae* (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Entretanto, a evolução de técnicas moleculares e de microscopia eletrônica levou à alteração do termo comum *Cyanophyceae* para Cyanobacteria, e estes micro-organismos, atualmente, são classificados como bactérias (KOMÁREK; HAUER, 2011).

O interesse para estes dois grupos distintos de micro-organismos fotoautotróficos reside no potencial de utilização da biomassa para as mais variadas aplicações, como alimentação humana e animal, produção de biocombustíveis, além da produção de metabólitos secundários (HARUN et al., 2010; SPOLAORE et al., 2006).

As microalgas aquáticas são reconhecidas por apresentarem eficiência fotossintética superior às plantas C₄, altas taxas de proliferação, grande capacidade de adaptação e crescimento em ambientes extremos, além de apresentarem excelente adaptabilidade a cultivos intensivos, o que as torna eficazes na redução do CO₂ atmosférico e produção de biomassa. Dos organismos fotossintetizantes, as microalgas tem maior eficiência no uso do CO₂ em comparação às plantas superiores, podendo fixar maiores quantidades (KURANO et al., 1995).

Segundo Gouveia et al. (2009), as microalgas podem alcançar elevadas produções de biomassa por área e, embora o seu mecanismo fotossintético seja similar ao de plantas superiores, as microalgas tem maior eficiência na conversão da energia solar, devido a sua estrutura celular simples e também pelo fato de crescer em meio aquoso, o que favorece o fornecimento de água, CO₂ e outros nutrientes para o seu desenvolvimento. De forma geral, apresentam elevadas taxas de crescimento, condição que proporciona alta produção de biomassa em intervalos de tempo curtos. A produtividade de sistemas algáceos é superior a qualquer cultura agrícola conhecida (PULZ; GROSS, 2004).

As microalgas podem alterar suas rotas metabólicas para excretar uma gama de compostos que irão atuar como inibidores de outros organismos. Diante

de sua capacidade de adaptação a diversos ambientes, podem apresentar vários tipos de metabolismos, sendo capazes mudar suas rotas metabólicas como resposta às mudanças das condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Uma biorrefinaria de microalgas pode beneficiar de diversos objetivos, tais como a produção de biomassa com altos teores de lipídeos para produção de biodiesel, altos teores de açúcares para produção combustíveis por meio de fermentação alcoólica (Bioetanol), fermentação no escuro (BioH₂) ou por digestão anaeróbica (Biogás-metano), altos teores protéicos, ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes para nutrição humana e carotenoides que podem ser usados como agentes corantes em alimentação humana e animal e na indústria cosmética (NOBRE et al., 2013; YANG et al., 2011). E após extração a possível utilização da biomassa residual na agricultura.

Alguns exemplos de produtos que podem ser obtidos nas biorrefinarias são os biocombustíveis, ácidos orgânicos, polímeros de açúcares e de proteínas, plásticos e agentes tensoativos biodegradáveis, polímeros específicos, novas fibras e enzimas (BATISTA et al., 2015). Uma das características das biorrefinarias está relacionada ao fato da biomassa vegetal ser constituída por diversas frações, de composição química variada, o que leva a importantes desafios em termos de pré-tratamentos, de modo a permitir a sua utilização de forma eficiente (RUZENE et al., 2008).

2.1.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma microalga pertencente à divisão Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales, família Chlorellaceae. São predominantemente microscópicas e de água doce, podendo existir em águas salgadas, na neve, no solo e sobre folhas de plantas terrestres. A espécie

Chlorella vulgaris possui forma esférica, medindo de 2 a 8 µm de diâmetro, unicelular e eucariótica, fotossintetizantes e com reprodução assexuada. Como pertence à divisão Chlorophyta, a espécie *Chlorella vulgaris* apresenta uma rica composição em carotenoides, nomeadamente α e β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina, que se encontram incorporados nas lamelas dos cloroplastos (BOCK; KRIENITZI; PRÖSCHOLD, 2011).

As células da espécie *Chlorella vulgaris* possuem coloração verde devido à presença dos pigmentos clorofila a e b em seu cloroplasto. Além da clorofila, apresenta ainda carotenoides. Em relação ao metabolismo, essas células são capazes de suplementar a quantidade de carbono pela utilização de matéria orgânica dissolvida na forma de açúcares, ácidos aminados e outras moléculas pequenas, caracterizando seu metabolismo como mixotrófico e heterotrófico (LOURENÇO, 2006).

A microalga *Chlorella* possui grande capacidade fotossintética, é rica em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos (HENRIKSON, 1994). Para, além disso, essa espécie geralmente é considerada como alimento seguro a saúde pelo Food and Drug Administration (FDA/EUA). Segundo Queiroz et al. (2003), esta microalga apresenta efeito terapêutico, e é utilizada como ração animal (LU; TAKEUCHI; SATOH, 2004).

Dentro do gênero *Chlorella*, diferentes espécies já foram descritas apresentando diferentes teores de lipídeos, como é o caso de *Chlorella ellipsoidea* com cerca de 4,5%, *Chlorella pyrenoidosa* com 2 a 12%, *Chlorella protothecoides* com aproximadamente 12% e *Chlorella emersonii* com 10 a 50% (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A *Chlorella vulgaris* apresenta teor de lipídeos de 10-13% e é uma das mais estudadas, devido à alta taxa de crescimento, fácil cultivo e difícil contaminação, mesmo em sistemas abertos (BATISTA et al., 2015; HUNTLEY; REDALJE, 2007).

Alguns meios de cultura alternativos vêm sendo avaliados para o cultivo de *Chlorella*, entre eles estão os efluentes industriais, efluentes de biodigestores, lodo digerido, esgoto doméstico e resíduos da produção animal. No entanto, pouca atenção tem sido dada a seleção de estirpes de microalgas para crescimento em águas residuais, com objetivo de selecionar as espécies mais eficientes na remoção de nutrientes concomitante com a produção de biomassa. A *Chlorella vulgaris* tem sido muito utilizada no tratamento de águas residuais, devido sua tolerância a altas concentrações de compostos orgânicos no meio de cultivo (HERNANDEZ; DE-BASHAN; BASHAN, 2006; LIANG; SARKANY; CU, 2009; TRAVIESOA et al., 2006).

2.1.2 *Scenedesmus obliquus*

As microalgas *Scenedesmus* sp., muito comum em águas doces e menos frequente em águas salobras, são clorofiladas, unicelulares e uninucleadas, pertencentes à família *Scenedesmaceae*, gênero *Scenedesmus*. Elas possuem forma elipsoidal, formam colônias planas (série linear) com as células agrupadas em número de 4, 8, raramente 16 ou 32 (STANKIEWICZ; ANDRADE; DOMINGUES, 1981).

Segundo Miranda, Passarinho e Gouveia (2012), a microalga *Scenedesmus obliquus* pode ser uma boa alternativa como matéria prima para produção de bioetanol, dado o elevado teor de açúcares. De acordo com Kessler (1991), a espécie *S. obliquus* apresenta um grande potencial de crescimento em águas residuais urbanas, registrando taxas de crescimento semelhantes as da mesma espécie cultivada em meio sintético. Esta microalga é tolerante a variações de pH e temperatura, o que pode ser uma justificativa para sua versatilidade para crescimento e tratamento de águas residuais.

Em estudos preliminares de acúmulo de lipídeos, foram avaliados os efeitos das alterações no pH, temperatura, presença de metais pesados, limitações de nitrogênio e fósforo, além do cultivo em diferentes fontes de carbono. Pelos resultados observou-se que o principal fator que afeta o potencial de acúmulo de lipídeos são as concentrações de nitrato, fosfato e tiosulfato de sódio (MANDAL; MALLICK, 2009).

2.2 Tipo de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser realizado por processo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Em cultura autotrófica, as microalgas utilizam luz como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese. Diferente deste, o cultivo heterotrófico é realizado quando a espécie de microalga utiliza carbono orgânico como fonte de energia e de carbono. O mixotrófico ocorre quando a microalga realiza o processo de fotossíntese e utiliza carbono orgânico e CO₂ como fonte de carbono para o seu crescimento (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHEN et al., 2011).

Os termos mixotrófico e heterotrófico apresentam uma diferença particular na fonte de energia necessária para suportar o crescimento e a produção de metabólitos específicos pelos micro-organismos. Assim, heterotrofia pode ser definida como a utilização somente de compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia, possibilitando o aumento da concentração de biomassa e sua produtividade. Já o termo mixotrofia é definido como um processo metabólico em que a fotossíntese é a principal fonte de energia, embora a presença de compostos orgânicos seja essencial. Neste caso, o organismo é capaz de assimilar compostos orgânicos como fonte de carbono enquanto utiliza compostos inorgânicos como doadores de elétrons (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A habilidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono aumentou o interesse nas relações entre fotossíntese e respiração de microalgas e cianobactérias. A maioria das cianobactérias utiliza o período escuro para ajuste da fotossíntese e dos mecanismos de biossíntese para uma posterior fase ativa na presença de luz. A glicose do meio de cultivo pode ser convertida em glicose 6-fosfato e metabolizada via respiratória. No entanto, algumas enzimas do ciclo de krebs são detectadas com atividades extremamente baixas e o metabolismo no escuro está ligado à presença de oxigênio, sendo que a principal rota é a via das pentoses fosfato (ARDELAN; ZARNEA, 1998; FAY, 1983). Assim, pode-se utilizar a capacidade de esses micro-organismos crescerem heterotroficamente na ausência de luz e substituírem a fixação do CO₂ atmosférico que ocorre nas culturas autotróficas por uma fonte de carbono orgânico dissolvido no meio de cultura, como uma alternativa interessante (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Acetato e glicose são as fontes de carbono mais utilizadas para cultivos mixotrófico e heterotrófico de microalgas e cianobactérias, tanto em pesquisa quanto em escala comercial (SHI et al., 1999). Entretanto, as informações acerca da concentração inicial destas fontes de carbono necessárias para o crescimento ideal dos micro-organismos são ainda muito dispersas (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

2.3 Sistemas de cultivo

Os sistemas de cultivo mais utilizados atualmente para o cultivo das microalgas são as lagoas aeradas abertas e os fotobiorreatores fechados (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHEN et al., 2011; HARUN et al., 2010; SINGH; NIGAM; MURPHY, 2011). De acordo com Dasgupta et al. (2010), os fotobiorreatores podem ser classificados em dois tipos principais: sistemas abertos (tanques aerados de alta taxa e com extremidades elípticas, raceway

ponds, e lagos) e os sistemas fechados (tubular, reator em placa, cônico, piramidal e fermentador). A escolha do sistema é influenciada pelas características do local de cultivo, pela espécie utilizada, quantidade de luz necessária e o sistema de colheita de biomassa do seu meio de cultura (ex: centrifugação, floculação, filtração etc) que se pretende utilizar.

Os fotobiorreatores fechados apresentam-se como os mais adequados para microalgas que podem ser rapidamente contaminadas por outros microorganismos, exceto para microalgas que conseguem sobreviver em condições ambientais extremas como alto pH (*Arthrospira (Spirulina)*, por exemplo) e alta salinidade (*Dunaliella*, por exemplo) ou podem crescer muito rapidamente (*Chlorella*, por exemplo) em tanques abertos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Tabela 1 Principais vantagens em sistemas de cultivo aberto e fotobiorreatores fechados.

Lagoas abertas	Fotobiorreatores fechados
<i>Vantagens</i>	
Simplicidade na operação	Possibilidade de produzir monoculturas
Menor investimento e custo de produção	Controle dos parâmetros de operação
Baixos consumos energéticos	Menor área e maior produtividade
<i>Desvantagens</i>	
Elevado grau de contaminação	Complexidade na operação
Necessidade de grandes áreas	Alto investimento e custo de produção
Sujeitos às condições climáticas	Elevados consumos energéticos
Menores produtividades	
Impossibilidade de controle de vários parâmetros	

Fonte: Adaptado de Huang et al. (2010), Miao e Wu (2006) e Xu, Miao e Wu (2006).

Muitas microalgas são potencialmente úteis para produção em grande escala; entretanto, a escolha de espécies envolve questões diversas, tais como a

velocidade de crescimento e sua composição química. Essas variáveis são influenciadas por alguns fatores como o meio de cultura utilizado, a idade do cultivo, a intensidade luminosa, a temperatura, a salinidade e o fotoperíodo (BROWN et al., 1997).

A produção em larga escala em sistemas fechados tem grande potencial para gerar produtos de alto valor agregado (PULZ, 2001; TOMASELLI, 2004). Para Rawat et al. (2013) a maioria dos sistemas de cultivos comerciais para a produção comercial em larga escala de microalgas foi limitada a produtos de alto valor, e não de biodiesel. Grandes avanços têm sido obtidos por pesquisadores de todo o mundo em termos de fotobiorreatores e estratégias de produção, capazes de aumentar a produtividade em biomassa (VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011).

2.4 Aplicações das microalgas

Há uma maior eficiência das microalgas para capturar energia solar e converte-la em biomassa, em comparação com as plantas (LI et al., 2008), as microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas e diversas espécies têm sido cultivadas para produzir substâncias específicas, devido a sua importância econômica, nutricional e ecológica (ANTELO et al., 2010).

Para a produção de um biocombustível a baixo custo para que todos os consumidores venham a ter acesso, a escolha do sistema de obtenção de microalgas para este fim é de fundamental importância, para além da possibilidade de maiores investimentos nessa área. Para isso, seria necessário o aperfeiçoamento do sistema de cultivo mais economicamente viável, com consequente redução de custos em todas as áreas (uso de água, nutrientes, energia, infraestrutura, entre outros). Uma alternativa que vem sendo pensada, atualmente, é o aproveitamento de efluentes industriais ou domésticos (como

fonte de nutrientes) e a própria infraestrutura (ou com adições) de uma Estação de Tratamento de Efluente (ETE), com sistema de lagoa de estabilização, para a obtenção de biomassa de microalgas (MULBRY et al., 2008). Além disso, os sistemas utilizados para a obtenção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, biogás, hidrogênio) devem ser integrados para um maior aproveitamento da biomassa e diminuição dos custos (HARUN et al., 2011; POWELL; HILL, 2009).

A biomassa de microalgas pode ter grande variação na sua composição bioquímica dependendo da espécie cultivada e das condições ambientais de cultivo, tais como concentração de CO₂, nutrientes, pH, iluminação (intensidade e fotoperíodo), temperatura, salinidade, densidade da população cultivada e idade da cultura entre outras. A biomassa de microalgas pode ser utilizada para extração de lipídeos para produção de biodiesel, amido para produção de bioetanol e/ou biohidrogênio, na indústria alimentícia para animais (pets) e humanos, aplicação em produtos cosméticos e utilização como biofertilizantes e condicionadores de solo.

A extração de lipídeos e carotenoides de microalgas pode ser realizada pelos métodos convencionais de extração, tais como o uso de solventes orgânicos e extração por Soxhlet, porém há a necessidade do uso de grande quantidade de solvente orgânico para realizar a extração. Recentemente tem sido dada uma importante alternativa frente ao uso dos métodos convencionais de extração o uso da Extração por Fluidos Supercríticos (SFE). Nesse processo, o CO₂ é o solvente supercrítico mais usado, pois através dele os compostos podem ser obtidos sem a contaminação por solventes orgânicos e sem a ocorrência da degradação térmica, uma vez que as temperaturas utilizadas são baixas (BAI et al., 2011; NOBRE et al., 2006, 2013).

2.4.1 Produção de Biocombustíveis

As microalgas podem ser utilizadas para a produção de inúmeros biocombustíveis líquidos e gasosos, tais como biometano, bioetanol, biodiesel, biohidrogênio e biogás. Esses biocombustíveis, produzidos a partir de microalgas podem ser uma alternativa aos combustíveis fósseis. A produção de biocombustíveis a partir de microalgas baseia-se primeiramente na produção de biomassa com elevadas produtividades e, no caso do uso para a produção de biodiesel, necessita-se ainda que esta biomassa apresente elevados percentuais de lipídeos (MONTERO; ARISTIZÁBAL; REINA, 2011). O teor de lipídeos de microalgas pode variar de 20 a 50% do seu peso seco com a possibilidade de atingir até 80% (SPOLAORE et al., 2006). As microalgas podem variar quanto ao teor de lipídeos e o tipo de ácidos graxos dependendo da espécie estudada e dos parâmetros de cultivo (GOUVEIA et al., 2009).

Após a extração dos lipídeos e dos pigmentos de microalgas, a biomassa residual pode ser usada no processo de fermentação para produção de hidrogênio ou de digestão anaeróbia para produção de biogás. A biorefinaria de microalgas, com obtenção de óleos para biodiesel, pigmentos para indústria alimentar humana/animal e cosmética, concomitante com a produção de biocombustível gasoso a partir da biomassa residual desempenha um papel duplo na produção de energia renovável e desenvolvimento sustentável da indústria de biodiesel de microalgas (NOBRE et al., 2013; YANG et al., 2011).

Como exemplo, a microalga marinha *Nannochloropsis sp.*, é comumente usada na aquicultura e tornou-se amplamente reconhecida como uma fonte potencial de lipídeos para produção de biodiesel (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; MOAZAMI et al., 2012). É considerada também como fonte importante de carotenóides tais como a astaxantina, cantaxantina e zeaxantina (LUBÍAN et al., 2000). Segundo Nobre et al. (2013), a microalga *Nannochloropsis sp.* tem

potencial como matéria prima na produção de ácidos graxos para produção de biodiesel, elevado conteúdo de carotenoides e biohidrogênio num contexto de biorrefinaria.

2.4.2 Tratamento de efluentes

Atualmente, uma questão preocupante para os municípios, é a elevada taxa de crescimento da população urbana e que tem gerado grandes quantidades de resíduos sólidos e efluentes líquidos o que representa um grande desafio para a sociedade (ARBIB et al., 2014). Segundo Pasqualino, Meneses e Castells (2011), a recuperação de águas residuais é crucial para uma melhor gestão dos recursos hídricos, e sua reutilização pode ajudar a mitigação da escassez regional ou sazonal de água. Neste contexto, as microalgas podem assumir um papel importante no tratamento de efluentes domésticos/urbanos, visto que em condições favoráveis de crescimento consomem com eficácia os nutrientes dos efluentes.

De acordo com Arbib et al. (2014) as microalgas podem simultaneamente crescer em efluentes domésticos/urbanos e produzir biomassa enquanto removem carbono orgânico e nutrientes inorgânicos (nitrogênio e fósforo) dos efluentes. O tratamento dos efluentes com microalgas oferece muitas vantagens em relação aos tratamentos convencionais: (1) o nitrogênio e o fósforo, removidos simultaneamente dos efluentes, podem ser convertidos em biomassa sem qualquer fonte externa de carbono orgânico; (2) o efluente descarregado em corpos de água receptores é oxigenado; e (3) produtos de alto valor podem ser extraídos a partir da biomassa.

Além disso, algumas espécies de microalgas têm-se mostrado potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, pois possuem a habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes incorporando-

os a sua biomassa (BASTOS et al., 2004; DE-BASHAN; BASHAN, 2010; QUEIROZ et al., 2007).

A utilização de microalgas e cianobactérias no tratamento de águas residuárias vêm sendo estudada, devido aos baixos custos envolvidos, quando esse procedimento é comparado aos sistemas convencionais de tratamento de efluentes. Além disso, soma-se a esta vantagem à valorização dos resíduos, com possibilidade de se obter uma biomassa passível de ser utilizada na fertilização dos solos, na forma de proteínas ou na obtenção de biocombustíveis (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; TAM; WONG, 2000). Contudo, essa aplicação encontra limitações, principalmente devido ao custo das condições autotróficas, além da turbidez característica das águas residuárias agro-industriais, que não permite penetração da luz de forma homogênea no sistema de cultivo (HEREDIA-ARROYO et al., 2011). Entretanto, a literatura reporta que, embora sejam organismos naturalmente fotossintetizantes, algumas linhagens de microalgas e cianobactérias apresentam a distinta capacidade de se desenvolver na ausência de luz: por meio dos metabolismos mixotrófico ou heterotrófico, elas consomem moléculas orgânicas solúveis, tais como acetato, ácidos orgânicos e açúcares (BASTOS et al., 2004, 2011; DE-BASHAN; BASHAN, 2010; DUMAS et al., 1998; FAY, 1992; JACOB-LOPES et al., 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A composição dos efluentes pode variar de acordo com sua origem e/ou época do ano. Muitos efluentes podem conter grande quantidade de matéria orgânica, ou ainda apresentar altas concentrações de metais tóxicos, representando um grave problema para o meio ambiente (DAL MAGRO; HEMKEMEIER; COLLA, 2011).

Segundo Batista et al. (2015) a biomassa produzida em efluentes é uma fonte de energia que pode ser processada para produção de biocombustíveis ou de outros produtos valiosos, como biofertilizantes, biopolímeros, bioplásticos,

lubrificantes, tintas e corantes e suas aplicações são dependentes da qualidade e composição bioquímica da biomassa.

Chlorella vulgaris Beyerink, uma Chloroficeae de água doce, é uma das microalgas mais estudadas no tratamento de água residuárias (ASLAN; KAPDAN, 2006; GONZÁLES; CANIZARES; BAENA, 1997; KIM et al., 2010). Já *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma Cyanobacteria de grande aplicação na valoração de resíduos agroindustriais no sul do Brasil, reconhecida pelo seu elevado teor protéico e pelo potencial de remoção de matéria orgânica de efluentes agroindustriais em cultivos heterotróficos (BASTOS et al., 2004, 2010; JACOB-LOPES; SCOPARO; FRANCO, 2008; QUEIROZ et al., 2007, 2011).

2.4.3 Bioprodutos

A utilização de microalgas como fonte de alimento, tanto para humanos como para animais, vem se destacando por apresentar potencial fonte de proteínas com aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, vitaminas, sais minerais, pigmentos, enzimas, antibióticos e outros metabolitos biologicamente ativos (GOUVEIA et al., 2006).

Algumas espécies de microalgas apresentam valores elevados de proteínas, como exemplo, as espécies *Spirulina maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Diacronema vlkianum* e *Isochrysis galbana* e para o conteúdo mineral as espécies *Spirulina máxima* e *Chlorella vulgaris* apresentaram valores de 31% e 24%, respectivamente (BATISTA et al., 2013). Esses teores de proteína e material mineral mostram um grande potencial no aproveitamento da biomassa de microalgas para nutrição vegetal (MARQUES et al., 2011; STAHL; SIES, 2005).

Dentre os mais de 400 carotenóides conhecidos, poucos são utilizados comercialmente, tais como β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina, licopenos, bixina entre outros. O uso mais importante dos carotenóides é como corantes alimentícios naturais, como aditivo para alimentação animal, em cosméticos e alguns podem apresentar ações anti-inflamatórias (DEL CAMPO et al., 2000; MARQUES et al., 2011).

2.5 Germinação de sementes

O surgimento de novos produtos para a incorporação de aditivos às sementes aumenta a cada ano. No entanto, pouco se sabe sobre o real efeito desses produtos à base de hormônios, micronutrientes, aminoácidos e vitaminas na qualidade fisiológica das sementes e na produtividade das culturas (FERREIRA et al., 2007).

A qualidade das sementes é avaliada por meio de duas características fundamentais: viabilidade e vigor. A viabilidade, avaliada principalmente pelo teste de germinação, procura determinar o máximo potencial germinativo da semente, oferecendo para isto, as condições mais favoráveis possíveis. O vigor representa atributos mais sutis da qualidade fisiológica, não reveladas pelo teste de germinação, e é determinado sob condições desfavoráveis, ou medindo-se o declínio de alguma função bioquímica ou fisiológica (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987).

A qualidade da semente é alcançada durante o processo de produção, devendo ser conservada até o momento da semeadura, garantindo um alto potencial de emergência de plântulas em campo e ganho em produtividade. A aplicação de reguladores de crescimento via semente tem sido proposta por várias empresas. Esses reguladores são definidos como substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicadas diretamente nas plantas, em sementes e no

solo, com a finalidade de incrementar a produção e melhorar a qualidade de sementes (SILVA et al., 2008).

Os bioestimulantes são complexos que promovem o equilíbrio hormonal das plantas, favorecendo a expressão do seu potencial genético, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular (ONO; RODRIGUES; SANTOS, 1999). O bioestimulante aplicado via sementes é capaz de originar plântulas mais vigorosas, com maior comprimento, matéria seca e porcentagem de emergência (SANTOS; VIEIRA, 2005). A ação do tratamento de sementes com bioestimulante pode ser avaliada pela qualidade fisiológica das sementes. Essa pode ser avaliada pelo teste de germinação e pelos testes de vigor.

O emprego de bioestimulante como técnica agronômica para otimizar a produção em diversas culturas é cada vez mais comum (DOURADO NETO et al., 2004). Os órgãos vegetais das plantas são alterados morfológicamente pela aplicação de bioestimulantes, de forma que o crescimento e o desenvolvimento deles são promovidos ou inibidos, o que influencia ou modifica os processos fisiológicos, e exerce controle da atividade meristemática (WEAVER, 1972).

Segundo Castro et al. (2008), como benefício da utilização dos bioestimulantes pode-se citar o aumento do crescimento e do desenvolvimento vegetal, proveniente do estímulo da divisão, diferenciação e o alongamento celular. Os mesmos autores ainda relatam aumento da absorção e da utilização de água e de nutrientes. Esses bioestimulantes podem agir na degradação de substâncias de reserva das sementes, que são constituídos por uma mistura balanceada dos grupos de hormônios vegetais conhecidos como auxinas, citocininas e giberelinas (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Entre as várias alterações, os reguladores de crescimento influenciam o metabolismo protéico, podendo aumentar a taxa de síntese de enzimas envolvidas no processo de germinação das sementes (MCDONALD; KHAN,

1983) e ainda no enraizamento, floração, frutificação e senescência de plantas (CASTRO; VIEIRA, 2001).

As plantas competem por luz, água e nutrientes, revelando uma concorrência constante entre as espécies que vivem em comunidade. Essa concorrência contribui para a sobrevivência das espécies no ecossistema, e algumas desenvolvem mecanismos de defesa que se baseiam na síntese de determinados metabólitos secundários, liberados no ambiente e que irão interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outra planta (SAMPIETRO, 2001).

A alelopatia pode ser definida como um processo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados, impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas (SOARES, 2000). Os efeitos alelopáticos são mediados por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários. Os recentes avanços na química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, têm contribuído bastante para um maior conhecimento desses compostos secundários, os quais podem ser agrupados de diversas formas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, sendo as mais sensíveis a *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática. Para que seja indicada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; GABOR; VEATCH, 1981).

Substâncias inibidoras, de diferentes categorias químicas, podem ser encontradas em sementes de várias espécies, interferindo no processo germinativo. Os efeitos dos ácidos fenólicos podem ser observados nos

processos biológicos das sementes. Einhellig, Schon e Rasmussem (1982) demonstraram efeitos sinérgicos de fenóis no alongamento da radícula, crescimento de plântulas e germinação de sementes.

Segundo Grzesik e Romanowska-Duda (2014), estudando a influência aplicação de *Cyanobacteria* e *Chlorella* sp. no enraizamento, crescimento de planta e na atividade fisiológica na cultura do vime (*Salix viminalis* L.), observaram que houve aumento significativo no enraizamento e crescimento da planta, além de intensificar atividade fotossintética. Também relatam que o uso de *Cyanobacteria* e *Chlorella* sp. podem ser uma forma de aplicação de biofertilizante não tóxico, sustentável e econômico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Nacional de Energia e Geologia de Portugal (LNEG), na unidade de Bioenergia, em Lisboa, Portugal. O experimento de caracterização química das biomassas microalgais e produção de extratos para aplicação em germinação de sementes de alface foi realizado no período de Fevereiro a Setembro de 2014.

O cultivo das microalgas foi realizado usando efluentes urbanos como meio de cultura e foi realizado no campus do Laboratório Nacional de energia e Geologia (LNEG), Alfragide, Lisboa (38°43'N, 9°12'W), altitude 0m, tendo sido utilizado um protótipo de fotobiorreator (PBR) tubular vertical de 150L nos tubos e capacidade total de 240 L incluindo tubos de ligações, recipiente de membranas, recipiente onde estavam acopladas as sondas de medição dos parâmetros do meio de cultivo, pH, O₂ e CO₂ dissolvido, nitrogênio, temperatura e iluminação. (Figura 1). O cultivo foi realizado no período de agosto de 2013 a

julho de 2014 e foram recolhidas águas residuais provenientes de águas residuais urbanas da companhia de tratamento Águas da Figueira em, Figueira da Foz, Portugal, recolhidas depois do tratamento primário, que serviram para alimentar o fotobiorreator (PBR).



Figura 1 Fotobiorreator fechado (PBR) tubular vertical.

Para as caracterizações da biomassa das microalgas e preparação dos extratos para germinação de sementes, as atividades foram desenvolvidas no LNEG, campus do Lumiar, na unidade de Bioenergia.

3.2 Cultivo das microalgas

Para realização do experimento foram utilizadas as seguintes espécies de microalgas: *Chlorella vulgaris* (INETI 58, LNEG_UB, Portugal) (Cv); *Scenedesmus obliquus* (ACOI 204/07, Universidade de Coimbra - Algoteca, Portugal) (Sc) e o Consórcio C (Cons. C), isolado a partir do efluente a ser tratado. Para o isolamento do Consórcio C o efluente foi filtrado utilizando microfibras de vidro (Whatman, EUA) e colocado para crescimento no laboratório em Erlenmeyers a 25 ± 2 °C, com luminosidade de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e

agitação de 130rpm, utilizando meio sintético de cultivo Bristol (STARR; ZEIKUS, 1993). Foram recolhidas amostras diárias para observação microscópica, encontrando-se as diferentes espécies de microalgas, entre elas *Chlorella*, *Chaetophora*, *Scenedesmus* e *Navicula*.

As microalgas (Cv, Sc e Cons. C), para serem inoculadas no PBR de 150 L, foram cultivadas em laboratório utilizando reatores cilíndricos de 10 L com meio Bristol (STARR; ZEIKUS, 1993), a 25 °C, com luz contínua de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (medida com um Phywe Lux-Meter) e agitado com ar comprimido filtrado, a uma taxa de fluxo de 1vvm.

O PBR foi instalado em área aberta no campus de Alfragide. Para agitação foi utilizado um compressor de ar, um módulo de membrana para filtrar e permear o efluente residual tratado e um decantador para concentrar a biomassa. O PBR, composto por 12 tubos de polimetacrilato de metilo (acrílico) dispostos verticalmente, com 10 cm de diâmetro e 200 cm de altura (figura 2), operou em modo de batelada e semi-contínuo.

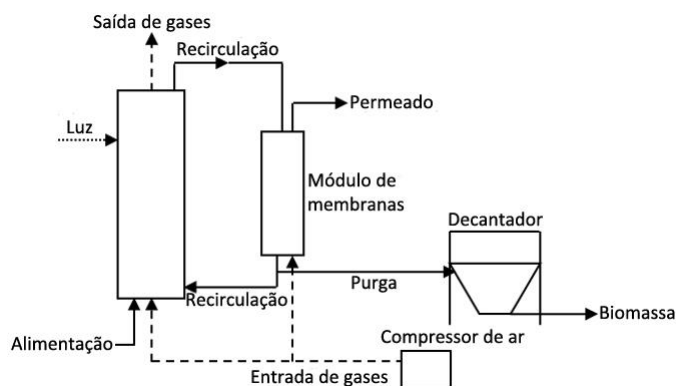


Figura 2 Esquema simplificado do Fotobiorreator de 150L.

Os ensaios no PBR foram conduzidos com água residual depois do tratamento primário ($\approx 240\text{L}$) e sem adição de qualquer suplemento. Foram testadas as três microalgas (Cv, Sc, Cons. C) para tratamento do efluente e para as inoculações foram efetuadas com um volume de inóculo calculado de modo a

ser obtida uma concentração inicial no PBR próxima de 0,3 de densidade ótica a 540nm. Quando os níveis de nutrientes no meio de cultura do PBR se encontravam baixo a cultura era colhida, cerca de 30L, juntamente com o outros 30 L de meio permeado (depois de passar pelas membranas), e nova alimentação era realizada ao PBR (60 L). Para indução de estresse nas culturas de microalgas, estas foram deixadas no PBR depois de terem esgotado os nutrientes da água residual. O tempo de permanência no PBR sem nutrientes variou de ensaio para ensaio, para o cultivo de Cv, Sc e Cons. C foram de 13, 12 e 24, dias, respectivamente.

3.3 Caracterização da biomassa microalgal

As microalgas foram colhidas sem floculação e foram armazenadas em camara frigorifica a 5 °C. Para obtenção da biomassa o meio foi centrifugando a 10000 rpm (Avanti J25, Beckman) durante 10 min e a massa úmida levada a estufa secadora a 70 °C.

Para caracterização química da biomassa microalgal foram avaliados os seguintes parâmetros: sólidos totais, sólidos voláteis, umidade, cinzas, conteúdo de lípidos e composição dos ácidos graxos, proteínas, açúcares e pigmentos. As biomassas foram previamente secas, moídas em um moinho de café e posteriormente em moinho de bolas, modelo Retsch - MM, durante 4 min a uma velocidade de 25 rpm.s⁻¹ (GOUVEIA et al., 2014).

Para a determinação dos sólidos totais, voláteis e cinzas as amostras com um peso conhecido foram colocadas na estufa para secagem a 105°C. O resíduo da secagem foi pesado, calculando-se o teor de sólidos totais. Seguidamente levou-se a mufla a 550°C e calculou-se o teor de sólidos voláteis pela diferença de peso entre os resíduos obtidos após secagem na estufa (sólidos totais) e após incineração na mufla (sólidos fixos). Para o calculo da umidade as amostras de

peso conhecido foram colocadas em estufa a 60 °C por 24h e pesada novamente obtendo-se o valor da umidade, por diferença.

A quantificação do teor de óleo foi realizada por extração em Soxhlet, durante seis horas, utilizando cerca de 1g de biomassa e n-hexano como solvente. A composição da fração lipídica foi determinada por cromatografia gasosa (GC) usando um CP-3800 GC (Varian, USA) equipado com uma coluna capilar de 30 m SUPELCOWAX 10 (0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura). As temperaturas do injetor (split 1:50) e detetor (flame ionization detector) foram mantidas constantes a 250°C. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 220°C, aumentado 20°C.min⁻¹, durante 16 min até atingir os 230°C e mantendo-se nesta temperatura durante 4 minutos. O gás de arrasto, hélio, foi mantido a uma taxa constante de 1,2 mL.min⁻¹.

A composição da fração lipídica foi calculada em percentagem, e determinada pelas áreas dos picos, de acordo com a Norma Europeia EN 14103 (EUROPEAN STANDARD - EN, 2003).

Para determinação do conteúdo de proteínas totais nas biomassas microalgais, foi utilizado o método modificado de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2006). Em um tubo de Kjeldahl foram colocadas 0,2g de biomassa seca, 5mL de água destilada e 50mL de solução de digestão (134g K₂SO₄ + 650mL H₂O + 200mL H₂SO₄ + 2g HgO/25mL H₂SO₄ (6N)). A biomassa foi digerida num equipamento de digestão (Buchi Digestion Unit K-424) durante 4 horas. Posteriormente, foi colocada no aparelho de destilação (Buchi Distillation Unit K-350) por 6 minutos com hidróxido de sódio e tiosulfato de sódio. Em seguida, adicionou ao destilado 50 mL de solução indicadora de ácido bórico e realizou a titulação com solução estoque de H₂SO₄ (0,02N), obtendo o valor de nitrogênio total. Para o cálculo do teor de proteína total aplicou-se o fator de conversão convencional de 6,25 (JONES, 1931).

O conteúdo total em açúcares foi determinado pelo método do reagente fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A curva de calibração utilizou padrões de glucose e os resultados dos hidratos de carbono totais nas amostras de microalgas. A extração de açúcares da biomassa algal foi realizada por meio da adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ - 2N) a 0,5g de biomassa seca e colocou-se na autoclave por 60 minutos a 121°C. Posteriormente a amostra foi filtrada por um filtro de 0,2µm. Este método foi otimizado por Miranda, Passarinho e Gouveia (2012) para a extração de açúcares da biomassa de microalgas.

A extração dos pigmentos foi realizada por meio de solvente orgânico acetona, usando bolas de vidro e vortex, até total descoloração da biomassa. Os pigmentos totais foram calculados por espectrometria, em espectrofotômetro, modelo Hitachi-2000, tendo a leitura sido feita entre os 380 e os 700nm. Para a quantificação dos pigmentos totais usou-se a equação de Beer Lambert (Equação 1) com um valor de 215L/(g.cm) como coeficiente ótico específico e o comprimento de onda da máxima absorvância das amostras (GOUVEIA et al., 1996).

Equação 1
$$\text{Pigmentos Totais (\%)} = \frac{A \times V \times f}{E_{1cm}^{1\%} \times m}$$

Onde A é a absorvância (ao comprimento de onda da máxima absorção), V é o volume total de pigmento extraído (mL), f é o fator de diluição, $E_{1cm}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção e m o peso da amostra (g). O coeficiente de extinção utilizado foi baseado na média de $E_{1cm}^{1\%}$ dos carotenóides maioritariamente encontrados nas microalgas (GOUVEIA; EMPIS, 2003).

3.4 Preparação dos extratos das microalgas

Para preparação dos extratos foi utilizada biomassa seca das microalgas obtidas após o tratamento das águas residuais. Foram preparados dois diferentes tipos de extração para preparação dos extratos, aquoso e metanólico. No preparo dos extratos foram utilizadas as seguintes concentrações de biomassa seca de microalgas: 2 g/L, 10 g/L e 20 g/L. No preparo dos extratos foi utilizado produto surfactante, lecitina de soja granulada, na concentração de 5 mg/mL.

No processo de preparação dos extratos, esses foram colocados em agitação a 200 rpm por 5 min. Para o extrato metanólico a biomassa foi colocada no solvente e posteriormente a solução de metanol foi evaporada e acrescido água obtendo as concentrações de 2, 10 e 20 g/L e colocado em agitação novamente por 5 min.

3.5 Aplicação dos extratos na germinação de sementes

Nos bioensaios foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) que foram acondicionadas em caixa tipo gerbox tendo como substrato duas folhas de papel mata-borrão, que foi embebido com 5 mL de extrato e para o tratamento controle utilizado 5 mL de água. Em cada uma das caixas gerbox foram colocadas 50 sementes e em cada tratamento foram utilizadas quatro caixas com 50 sementes cada, totalizando 200 sementes por tratamento. Os gerbox foram mantidos em estufa B.O.D. à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 14 horas.

A germinação das sementes foi monitorada por sete dias consecutivos, com contagens diárias das sementes germinadas, sendo consideradas germinadas sementes com radícula de pelo menos 2 mm. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Índice de Velocidade de Germinação (IVG): $IVG = N1/1 + N2/2 + \dots + Nn/n$, onde Nn = número de sementes germinadas no primeiro, segundo e enésimos dias após a sementeira nos gerbox, respectivamente (MAGUIRE, 1992). Dessa forma, o IVG pode variar de zero, se nenhuma semente germinar a 100, se todas as sementes germinarem no primeiro dia.
- Germinação final: contagem do número de sementes consideradas germinadas no sétimo dia após a sementeira.
- Germinação no terceiro dia: constou da contagem do número de sementes consideradas germinadas no terceiro dia após a sementeira.
- Tamanho de radícula e hipocótilo: ao sétimo dia, após a análise da germinação das plantas, as partes aéreas e radiculares das plântulas foram medidas utilizando-se régua graduada e os resultados médios expressos em centímetros de plântula.
- Matéria seca: para obtenção do valor de matéria seca, após a análise da germinação das plantas, medição das partes aéreas e radiculares, as plântulas foram acondicionadas em saco de papel e levadas a estufa a 60°C por 24h, e pesado sendo o valor expresso em mg.
- Matéria seca/planta: para obtenção desse parâmetro foi feita uma relação entre o valor obtido para matéria seca e o número de plantas germinadas.

3.6 Estatística

O experimento foi conduzido em esquema fatorial triplo (3x2x3), constando de seis diferentes biomassas de microalgas, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris* estresse, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus obliquus* estresse, Consorcio C e Consorcio C estresse, dois tipos de extração, aquoso e

metanólico e três concentrações de biomassa nos extratos, 2, 10 e 20g/L. Os testes de germinação foram realizados com quatro repetições de 50 sementes.

Os dados obtidos na avaliação dos parâmetros foram analisados, por meio de análise de variância, com o software SISVAR e utilizou-se comparação de médias utilizando teste de Scott-Knott a ($p < 0,05$) de probabilidade de erro (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da biomassa

A caracterização bioquímica, quanto a sólidos totais, sólidos voláteis, umidade, cinzas, proteínas, açúcares totais, teor de óleo e pigmentos totais, das biomassas das microalgas estudadas, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e Consórcio C, em condições normais e com estresse no cultivo, estão apresentados nos itens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3.

4.1.1 *Chlorella vulgaris* (Cv)

Os resultados apresentados de proteínas totais, açúcares totais, teor de óleo e pigmentos totais estão apresentados em base seca e os resultados obtidos na caracterização bioquímica da espécie, foi observado uma variação significativa dos valores de proteínas totais, teor de óleo e pigmentos totais, quando a mesma espécie é colocada em condições de estresse (St) (gráfico 1).

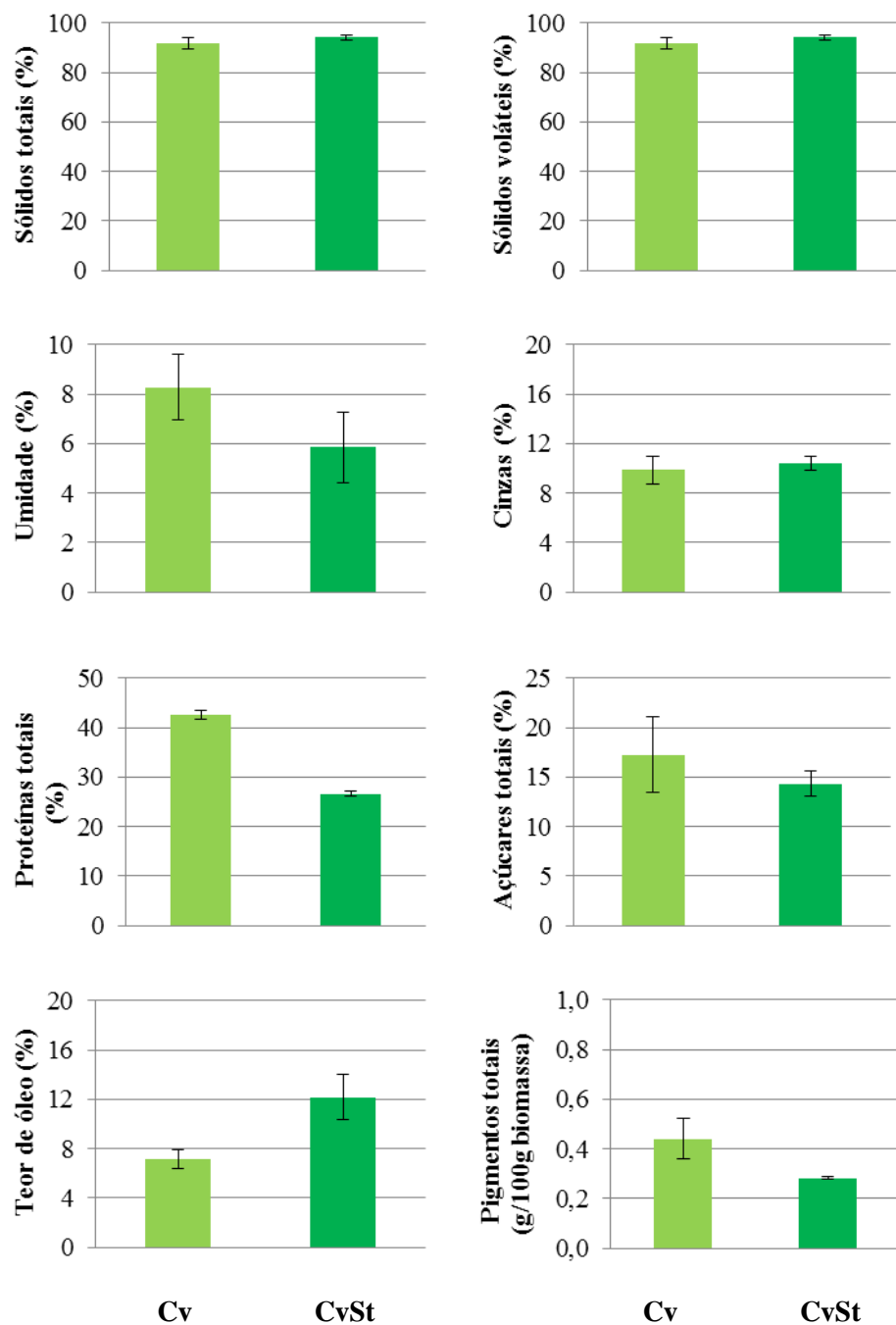


Gráfico 1 Caracterização bioquímica da biomassa da espécie *Chlorella vulgaris* (Cv) e *Chlorella vulgaris* estressada (CvSt).

Quanto aos teores de proteínas e pigmentos totais a espécie estudada sem estresse apresenta maiores teores, mostrando que são as formas de acúmulo de reservas naturais, pois quando colocada em condições de estresse o teor de óleo acumulado na biomassa é maior, isto evidencia que quando estressada a espécie aumenta o acúmulo de reservas nutricionais na forma de lipídeos. De acordo com Converti et al. (2009), condições de estresse a espécie *Chlorella vulgaris*, tais como variação na temperatura e diminuição da concentração de nitrato no meio de cultivo, pode resultar em alterações significativas na composição celular, favorecendo o acúmulo de lipídeos.

O conteúdo de proteínas para a microalga *Chlorella vulgaris* (Cv), em ambas as situações nutricionais, é elevado. Os valores encontrados para Cv são semelhantes aos obtidos por He et al. (2013) e maiores aos relatados por Arbib et al. (2014), 42% e 22%, respectivamente. Já quando a em condições de estresse o valor encontrado é menor que o encontrado por He et al. (2013) e maior aos reportados por Arbib et al. (2014). Foram também relatados por Batista et al. (2013) valores de 38% e 12% para biomassa de *C. vulgaris* verde e carotenogénica, respectivamente.

Na literatura são apresentados valores de conteúdo lipídico, para Cv, de 13-30% em cultivos em águas residuais, em função das características específicas de cultivo (ARBIB et al., 2014; HE et al., 2013; JI et al., 2013). Valores relatados na literatura são superiores aos valores encontrados. Contudo, Gouveia e Oliveira (2009) obtiveram um conteúdo lipídico inferior (5,1%) aos encontrados para esta espécie, quando sujeita a deficiência de nitrogênio.

Os valores obtidos para açúcares totais (18 e 15%, respectivamente) são menores que os relatados por Batista et al. (2013) para Cv verde (20%) e carotenogénica (23%), mas superiores aos reportados por He et al. (2013), cerca de 14%. Os valores obtidos para o conteúdo de pigmentos totais são muito inferiores aos relatados por Batista et al. (2013), que foi de 1,2%.

4.1.2 *Scenedesmus obliquus* (Sc)

Os resultados apresentados de proteínas totais, açúcares totais, teor de óleo e pigmentos totais estão apresentados em base seca. No gráfico 2, podem ser observados a variação significativa dos resultados encontrados para teores de sólidos voláteis, cinzas, proteínas, teor de óleo e açúcares totais, quando cultivadas em condições de estresse (St). Nessas condições de estresse a microalga avaliada apresenta aumento nos teores de açúcares totais, teor de óleo e de pigmentos totais.

Chu et al. (2014), relatou aumento significativo nos teores de açúcares na espécie *Scenedesmus obliquus* quando aplicado tratamentos de limitação de nitrogênio e fosforo e obteve valores semelhantes (25-28%) aos observados (29%). O acúmulo de lipídeos e açúcares, devido ao estresse nutricional de falta de nitrogênio também foi reportado por Breuer et al. (2012) para as espécies *S. obliquus*, *Chlorella zofingiensis*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Neochloris oleoabundans*.

Foram obtidos valores superiores, em 20, 16 e 12% aos relatados na literatura quanto ao teor de proteínas, todos produzidos em meios sintéticos, sem deficiências de nitrogênio (ARBIB et al., 2014; BATISTA et al., 2015; MARTINEZ et al., 2000), respectivamente. Wang et al. (2013), relatou valores de 33% e 8% de proteína, com e sem estresse, cultivadas em laboratório utilizando meio de cultura.

Para o teor de óleo os valores apresentados pela espécie foram inferiores aos relatados pela literatura que se encontram no intervalo de 17 a 29% (ARBIB et al., 2014; BATISTA et al., 2015; JI et al., 2013).

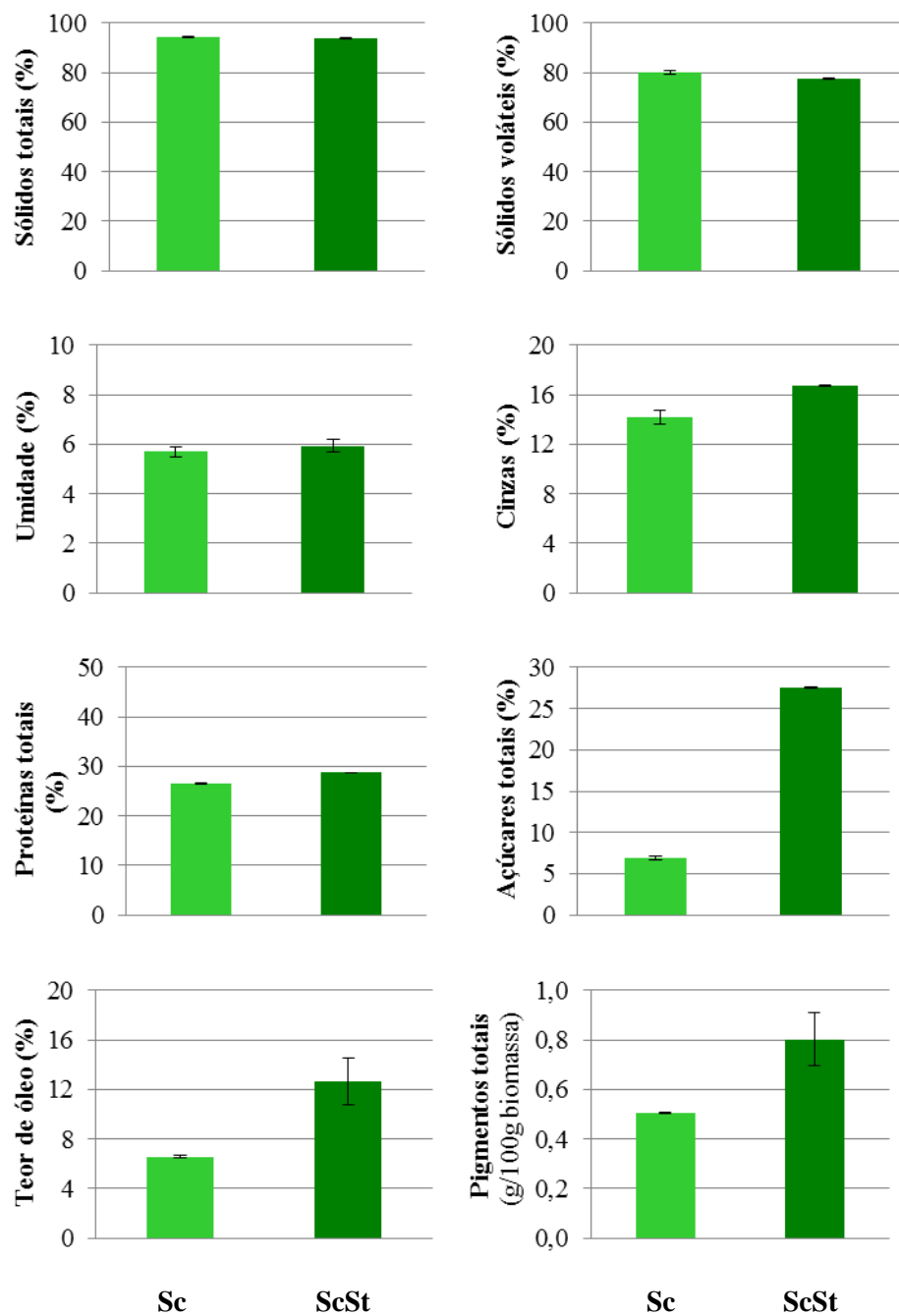


Gráfico 2 Caracterização bioquímica da biomassa da espécie *Scenedesmus obliquus* (Sc) e *Scenedesmus obliquus* estressada (ScSt).

Quanto ao teor de açúcares totais os valores encontrados para Sc são inferiores aos relatados por Batista et al. (2015), Ho, Chen e Chang (2012) e Miranda, Passarinho e Gouveia (2012), que obtiveram 31%, 32% e 52%, os dois primeiros produzidos em laboratório em meio Bristol e o último cultivado em condições de estresse de nitrogênio. Os valores obtidos de pigmentos totais são maiores ao encontrado por Hodaifa, Martinez e Sanchez (2010).

4.1.3 Consorcio C. (Cons. C)

Os dados obtidos na caracterização da biomassa das microalgas do Consorcio isolado a partir dos efluentes usados como meio de cultura e em condições de estresse nutricional estão apresentados no gráfico 3. Ressaltando que os resultados apresentados de proteínas totais, açúcares totais, teor de óleo e pigmentos totais estão apresentados em base seca.

O Consorcio apresentou variações quanto aos teores de proteínas, de óleo e pigmentos totais. Em condições normais de cultivo apresentou maiores valores de proteínas e pigmentos totais, enquanto em condições de estresse o teor de óleo foi maior relativamente ao inicial.

Os valores obtidos no cultivo do consórcio em condições normais de cultivo em águas residuais mostrou maior eficiência no acúmulo de proteínas e de pigmentos totais, quando comparadas aos valores encontrados no mesmo cultivo em condições de estresse, cultivo esse onde houve variação no teor de óleo encontrado, com maior teor no estudo de microalga com estresse.

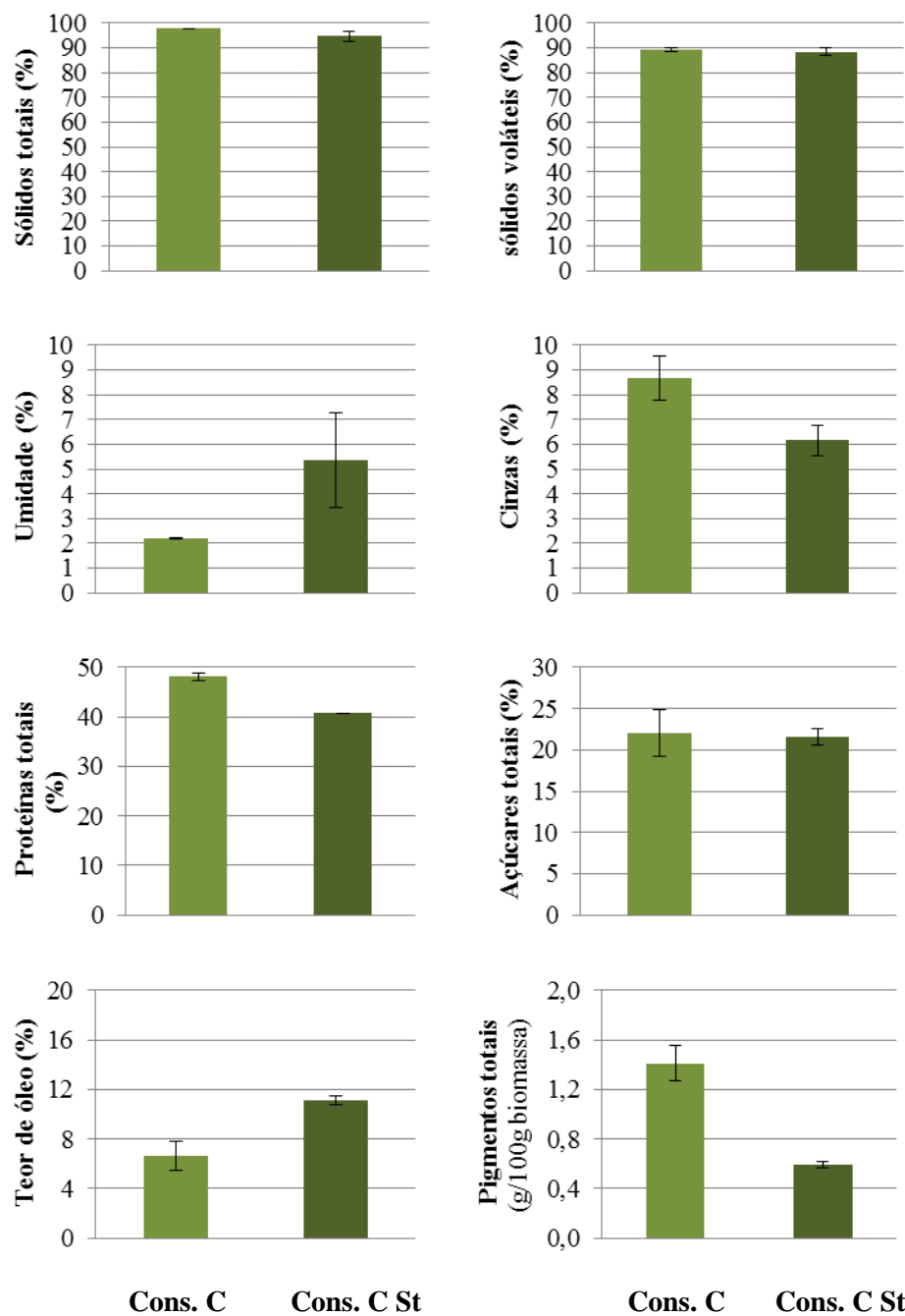


Gráfico 3 Caracterização bioquímica da biomassa do Consórcio C. (Cons. C) e do Consórcio C. estressado (Cons. C St).

4.1.4 Perfil ácidos graxos

A caracterização do perfil de ácidos graxos presentes nas amostras de óleo extraídas das biomassas microalgais, *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consórcio C, em condições de cultivo convencionais e estressadas, estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 Ácidos graxos presentes nos extratos de óleo de *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consórcio C (Cons. C).

Ácidos Graxos	Ch (% p/p)	Ch_St (% p/p)	Sc (% p/p)	Sc_St (% p/p)	Cons C (% p/p)	Cons C_St (% p/p)
C8:0	0,12	-	-	0,37	0,18	-
C10:0	0,75	0,77	-	0,33	0,04	0,28
C12:0	0,07	0,21	-	-	0,03	0,09
C14:0	0,60	0,49	2,35	0,42	0,41	0,64
C16:0	20,03	24,25	36,96	27,21	20,83	21,35
C16:1	1,74	1,97	1,93	2,32	3,80	2,65
C17:0	0,52	0,52	1,23	-	-	0,36
C18:0	0,94	1,97	5,80	3,00	1,20	1,70
C18:1	12,40	27,09	18,86	40,95	12,13	21,76
C18:2	11,87	9,60	5,48	7,91	13,04	6,79
C18:3	24,30	18,40	6,65	11,12	18,76	20,34
C20:0	1,79	2,61	-	0,90	2,28	3,15
C22:0	1,33	-	13,29	-	-	0,81
C24:0	0,12	-	-	-	-	-
Saturados	26,50	30,82	59,62	32,24	24,98	28,38
Insaturados	50,30	57,06	32,92	62,29	47,74	51,54
TOTAL	76,81	87,88	92,54	94,53	72,71	79,92
outros	23,19	12,12	7,46	5,47	27,29	20,08

O perfil de ácidos graxos dos óleos extraídos da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* contém em sua composição 50% de ácidos graxos insaturados, sendo a maior quantidade identificada de ácido oleico – 18:1 (12,4%), ácido linoleico - 18:2 (11,8%) e ácido afaíinolênico – 18:3 (24,3%), contém também identificado 26,5 % de ácidos graxos saturados, destacando-se o ácido palmítico – 16:0 (20%). Quando em condições de estresse a maioria dos ácidos graxos identificados foram insaturados (57%), a maior diferença observada foi do ácido oleico – 18:1, variando de 12% sem estresse para 27% com estresse.

Segundo Ji et al. (2013), em estudo com efluente de suinicultura, sem indução de estresse, obteve para C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, valores de 26%, 19%, 17% e 24% para *C. vulgaris* e 24%, 15%, 33% e 27%, para *S. obliquus* respectivamente. Valores relatados foram maiores que os observados para *C. vulgaris* (C 16:0 - 20%, C 18:1 – 12%, C 18:2 – 12%) e semelhante para C 18:3 (24%). Já para *S. obliquus* os valores obtidos foram maiores tanto em condições com e sem estresse para a quantidade de C 16:0 e C 18:1, e menores na quantidade de C 18:2 e C 18:3.

Breuer et al. (2012), relatou em cultivo em condições de estresse nutricional de nitrogênio variação significativa nos valores de ácido oleico, variando de 4% para 47%, para *C. vulgaris* e de 22% para 50% para espécie *S. obliquus*, comportamento semelhante aos observados nessa pesquisa. De acordo com os autores esse comportamento pode ser relacionado a possível redução da membrana do tilacoide, ocasionando a variação do perfil dos ácidos graxos acumulados.

No perfil de ácidos graxos identificados na espécie *Scenedesmus obliquus* foi identificado 59,6% de ácidos graxos saturados e 32,9% de ácidos graxos insaturados. Dentre os ácidos graxos saturados, destaca-se o ácido palmítico – 16:0 (36,9%). Para os insaturados a maior quantidade identificada é

do ácido oleico – 18:1, com 18,8%. Quando submetidas a condição de estresse ocorre variação no perfil de ácidos graxos, sendo identificados 62,2% de ácidos graxos insaturados e 32,2% de ácidos graxos saturados. Dentro dos ácidos graxos insaturados destaca-se o ácido oleico – 18:1, com 40,9%, e 27,2% de ácido palmítico dentro dos ácidos graxos saturados.

Para o consorcio o perfil de ácidos graxos é constituído de 47,7% de ácidos graxos insaturados e 24,9% de ácidos graxos saturados. Nos ácidos graxos insaturados destaca-se o ácido oleico – 18:1 (12,1%), ácido linoleico – 18:2 (13,0%) e ácido alfa-linolênico – 18:3 (18,7%). Dentro dos ácidos graxos saturados, o encontrado em maior quantidade é o palmítico – 16:0 (20,8%). Quando o consorcio foi cultivado em condições de estresse a proporção de ácidos graxos saturados e insaturados mantém-se com mesmo comportamento, com destaque para os ácidos graxos oleico (21,7%), linoleico (6,7%) e alfa-linolênico (20,3%). Dentro dos saturados, tem-se em maior quantidade o ácido palmítico (21,3%).

4.2 Aplicação de extratos de microalgas

Os extratos foram aplicados nos substratos para germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e os resultados obtidos da aplicação dos extratos, aquoso e metanólico, estão apresentados de acordo com as variáveis analisadas.

4.2.1 Extrato aquoso

Os extratos aquosos produzidos foram aplicados em sementes de alface e os resultados de sua aplicação no teste de germinação de sementes estão apresentados conforme os parâmetros analisados, índice de velocidade de

germinação, germinação final, germinação ao terceiro dia, tamanho de radícula, tamanho de hipocótilo, matéria seca total e matéria seca por planta.

4.2.1.1 Índice de velocidade de germinação – IVG (%)

Para a avaliação do IVG (tabela 3 e gráfico 4), com aplicação dos extratos aquosos, de biomassas das espécies cultivadas em condições de estresse, na concentração de 2 g/L no Cons. C observou-se maior valor, seguido pelo Sc e Cv que propiciou o menor valor. Já para a concentração de 10 g/L o Cons. C e a Cv não diferiram e foram maiores a Sc. Na concentração de 20 g/L, o Cons. C foi o que apresentou o maior valor, seguido da Cv e Sc que obteve menor valor.

Quando avaliados os extratos preparados com a biomassa das microalgas cultivadas em condições normais, dentro da concentração de 2 e 10 g/L os maiores valores de IVG foram observados quando o substrato foi embebido com extrato de Cons. C e Sc seguido pelos valores da Cv. Já para a concentração de 20 g/L no Cons. C obteve-se maior valor, seguido da Cv e da Sc onde foi observado o menor resultado.

Os maiores valores observados de IVG dentro de cada concentração na biomassa cultivada em condições de estresse foram maiores aos observados por Souza et al. (1999) avaliando extratos de Mucuna (*Mucuna aterrima*), Capim colônia (*Panicum maximum*), Capim gordura (*Melinis minutiflora*) e Bambu (*Bambusa spp.*) e foram semelhantes aos resultados obtidos na aplicação de extrato de Capim Jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), ambos na concentração de 25% v/v.

Tabela 3 Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C, submetidas a condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,26	Cb	21,90	Ba	20,56	Aa	13,04	Cb	19,58	Ba	17,89	Ba
Sc	16,61	Bb	25,86	Aa	13,65	Bb	17,28	Ba	11,44	Cb	15,49	Ca
Cons. C	24,61	Aa	28,13	Aa	22,25	Ab	28,37	Aa	24,43	Aa	27,39	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

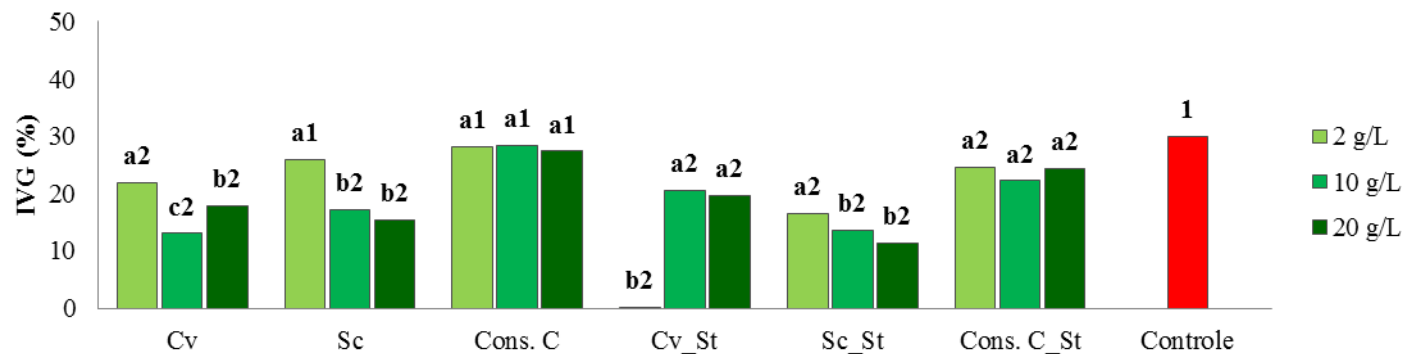


Gráfico 4 Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Quando comparados à influência do estresse na mesma concentração, dentro a Cv na concentração de 2 g/L os resultados de IVG aplicando extrato preparado com a microalga em condições normais foi maior aos resultados dos extratos em condição de estresse. Para a concentração de 10 g/L na mesma espécie os resultados do extrato da biomassa da microalga cultivada em condições de estresse foi maior. Na concentração de 20 g/L não houve diferença significativa dos resultados. Na espécie Sc quando comparados os valores dentro de cada concentração em condições de cultivo com estresse e sem, os resultados foram maiores aos das espécies cultivadas sem estresse em todas as concentrações. Para o Cons. C nas concentrações de 2 e 20 g/L não houve diferença significativa quando comparados a influência do estresse dentro de cada concentração, já dentro da concentração de 10 g/L os valores obtidos da aplicação do extrato da microalga na condição sem estresse foi maior que o resultado do extrato da biomassa da microalga estressada.

A Cv em condições de estresse nas concentrações de 10 e 20 g/L os valores de IVG foram maiores que os de 2 g/L. Para a Sc o melhor resultado foi obtido para o extrato em concentração de 2 g/L quando comparado com os resultados das concentrações de 10 e 20 g/L, que não diferiram. No Cons. C os valores de IVG das concentrações do extrato aquoso da biomassa do cultivo em condições de estresse não diferiram.

Na avaliação das concentrações dentro da espécie Cv o melhor resultado foi obtido na concentração de 2 g/L, seguido da 10 g/L e de 20 g/L que foi o menor valor. Já para a Sc o melhor resultado foi obtido na concentração de 2 g/L e nas concentrações de 10 e 20 g/L não tiveram diferenças significativas. Para o Cons. C não foram encontradas diferenças significativas para as diferentes concentrações.

Na comparação dos extratos com o tratamento controle foi observado que o resultado do controle juntamente com os resultados da aplicação dos

extratos de produzidos com biomassa do consorcio C e da Sc (2 g/L) foram maiores que os observados pelos demais. Esses resultados nos permite inferir que existe efeito de inibição nos processos de germinação quando aplicado os extratos produzidos com biomassa das microalgas.

4.2.1.2 Germinação final (%)

A germinação final (tabela 4 e gráfico 5) quando comparando as espécies de algas em condições de estresse dentro de cada concentração, os resultados obtidos na concentração de 2 g/L para Sc e Cons. C não diferiram significativamente e foram maiores ao da Cv. Na concentração de 10 e 20 g/L os valores na Cv e no Cons. C não diferenciaram e foram maiores aos da Sc. Quando avaliados os extratos obtidos do cultivo em condições sem estresse, na concentração de 2 g/L a Cv e a Sc não diferiram significativamente quanto a germinação final e foram maiores a obtida do Cons. C. Nas concentrações de 10 e 20 g/L a Cv e o Cons. C não tiveram diferenças significativas e foram maiores aos da Sc.

Os maiores valores observados, que variaram de 72 – 84% foram menores aos observados por Alves et al. (2004) estudando a aplicação de extrato aquoso nas concentrações de 0,001 e 0,010 % v/v de óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), capim-citronela (*Cymbopogum citratus* (DC) Stapf.), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) e jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf. ex. Wardleworth), também menor ao observado para extrato de folha seca de tiririca (*Cyperus rotundus*), na concentração de 10% v/v (ANDRADE; BITTENCOURT; VESTENA, 2009). Resultados esses que indicam uma maior eficiência na inibição do IVG, na aplicação de extrato de microalgas na germinação de sementes de alface, quando comparado com os extratos de plantas referidos.

Tabela 4 Resultados de germinação final (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	3,25	Bb	85,25	Aa	82,25	Aa	78,00	Aa	75,25	Aa	78,75	Aa
Sc	72,00	Aa	80,00	Aa	62,75	Ba	64,75	Ba	56,00	Ba	60,75	Ba
Cons. C	80,25	Aa	74,00	Ba	75,25	Aa	82,00	Aa	84,00	Aa	75,25	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

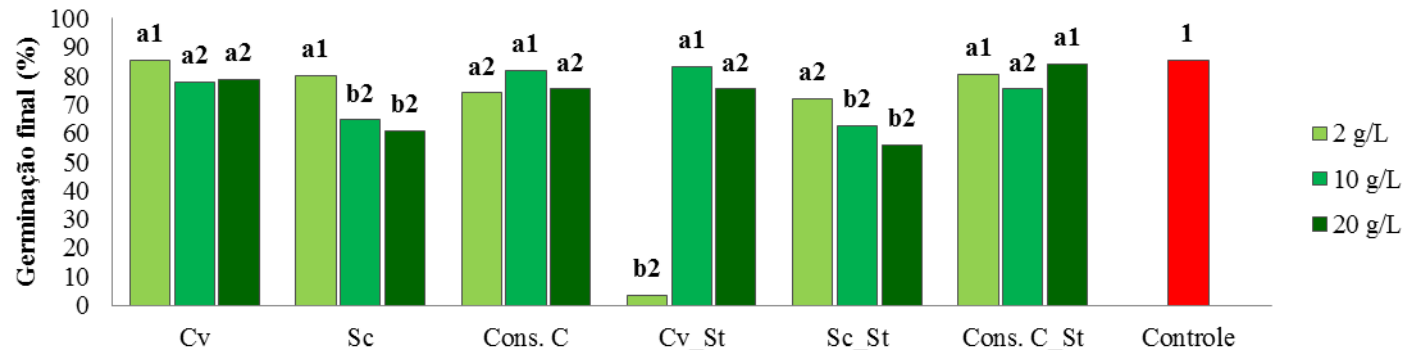


Gráfico 5 Resultados de germinação final (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Mano (2006), também relatou valor superior de germinação na aplicação de extrato aquoso (0,19 mg/mL) de Cumaru (*Amburama cearenses* S.). Os resultados do uso de extrato (4% v/v) do caule de *Andira Humilis* MART EX. BENTH e *Anacardium humile* MART e extratos aquosos de Capim Jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), Mucuna (*Mucuna aterrima*), Capim colônia (*Panicum maximum*), Capim gordura (*Melinis minutiflora*) e Bambu (*Bambuza* spp.), na concentração de 25% v/v, foram superiores (PERIOTTO, 2003; SOUZA et al., 1999).

Valores semelhantes aos observados no experimento foram relatados por Andrade, Bittencourt e Vestena (2009), na aplicação de extratos de Tiririca (*Cyperus rotundus*), na concentração de 100% v/v, Bonfim (2007), também relatou valores semelhantes quando aplicados extratos de folha de *Brachiaria decumbens* e *Melinis minutiflora*. Os valores obtidos por Gatti (2013) na utilização de extratos de *Aristolochia esperanzae* (25% v/v) são semelhantes aos observados.

Periotto (2003), quando utilizou extrato (16% v/v) de *Andira humilis* MART EX. BENTH, Prichoa et al. (2013), na aplicação de extrato de *Cryptocarya moschata* e *Ocotea odorifera* (0,25% v/v), Silveira et al. (2014), utilizando extrato (2,5% v/v) de folhas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, obtiveram resultados semelhantes aos observados para os maiores valores obtidos na aplicação dos extratos de microalgas.

Gatti (2003) relatou valores inferiores quando aplicando extratos de *Anemopargna arvensis*, *Bachaus dracunculifolia*, *Casearia sylvestris*, *Drymis brasiliensis*, *Memora peregrina*, *Palicourea rígida* e *Peritassa campestris*, ambas espécies nativas de cerrado. Mano (2006), quando aplicado extrato aquoso (3,13 mg/mL) de Cumaru (*Amburama cearenses* S.), obteve valores menores. Prichoa et al. (2013) e Silveira et al. (2014), também relataram valores menores quando aplicados extratos (1% v/v) de *Cryptocarya moschata* e *Ocotea*

odorifera e *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, na concentração de 7,5% v/v, respectivamente.

Quando comparados os resultados da mesma microalga e mesma concentração do extrato em condições de cultivo, com e sem estresse, para Cv na concentração 2 g/L em condição de estresse foi menor ao encontrado em condição sem estresse, para as concentrações de 10 e 20 g/L não houve diferença nos resultados com e sem estresse. Para a Sc e o Cons. C não houve diferenças significativas quando comparadas cada concentração com e sem estresse.

Dentro dos extratos preparados com biomassa cultivadas em condições de estresse, para a espécie Cv, os resultados nas concentrações de 10 e 20 g/L não diferiram significativamente, comparados com os obtidos da concentração de 2 g/L. Para a Sc o maior valor obtido foi na concentração de 2 g/L e os valores encontrados nas concentrações de 10 e 20 g/L não diferiram entre si e foram menores ao apresentado pelo primeiro. Para o Cons. C os valores não diferiram independente da concentração.

Em condições de cultivo sem estresse não houve diferenças significativas nos resultados de germinação dentro da Cv e dentro do Cons. C nas diferentes concentrações. E para a Sc o maior valor foi obtido na concentração de 2 g/L e não houve diferença nos valores nas concentrações de 10 e 20 g/L.

Os resultados da aplicação do extrato produzido com biomassa de *S. obliquus* ressaltam o efeito inibitório da germinação das sementes à medida que se aumenta a concentração de biomassa nos extratos.

4.2.1.3 Germinação ao terceiro dia (%)

Quando avaliados a aplicação dos extratos (tabela 5 e gráfico 6) da biomassa cultivada em condições de estresse dentro da concentração 2 g/L para

Sc e Cons. C os resultados não diferiram e foram maiores aos da Cv. Para a concentração de 10 e 20 g/L os resultados de germinação ao terceiro dia da Cv e Cons. C não diferiram e foram maiores aos valores obtidos pela Sc.

Os extratos produzidos com as biomassas das microalgas cultivadas em condições normais (sem estresse), na concentração de 2 g/L, as espécies não diferiram. Para a concentração de 10 g/L, o Cons. C obteve o maior valor, seguido pela Sc e com menor valor a Cv, já a concentração de 20 g/L, os valores da Cv e do Cons. C não diferiram e foram maiores ao resultado obtido para a Sc.

Na comparação do efeito do estresse na Cv na concentração de 2 g/L, o maior resultado foi no cultivo sem estresse, na concentração de 10 g/L ocorreu o inverso, com a condição de estresse apresentando o maior valor. Na concentração de 20 g/L as condições com e sem estresse não influenciaram a germinação no terceiro dia.

Para os resultados da Sc o efeito do estresse somente foi observado na concentração de 2 g/L, sendo o valor encontrado na condição de cultivo sem estresse maior ao com estresse. No Cons. C não houve diferença significativa nos resultados no cultivo com e sem estresse nas diferentes concentrações.

Para as variações dos valores de germinação ao terceiro dia entre as concentrações, dentro da espécie Cv os resultados da concentração 2 g/L foram maiores que os resultados de 20 g/L que foram maiores que os de 10 g/L. Para os resultados da Cv estressada os valores registrados para as concentrações de 10 e 20 g/L não diferiram e foram maiores aos da concentração de 2 g/L. Para a Sc e Sc estressada os resultados obtidos com aplicação do extrato na concentração de 2 g/L foram maiores aos encontrados nas concentrações de 10 e 20 g/L que não diferiram. Já dentro do Cons. C e no Cons. C estressado a concentração não alterou os resultados obtidos.

Tabela 5 Resultados de germinação ao terceiro dia (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,00	Bb	80,75	Aa	67,50	Aa	42,75	Cb	66,00	Aa	64,75	Aa
Sc	59,25	Ab	75,00	Aa	49,25	Ba	53,25	Ba	46,75	Ba	53,25	Ba
Cons. C	66,75	Aa	68,75	Aa	65,25	Aa	70,00	Aa	73,25	Aa	70,75	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

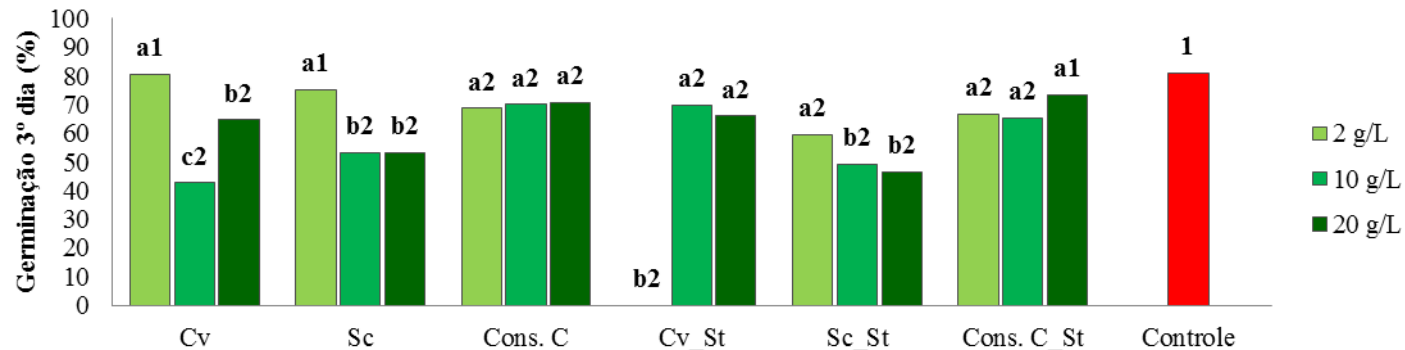


Gráfico 6 Resultados de germinação ao terceiro dia (%), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

4.2.1.4 Tamanho de radícula (cm)

Os resultados de tamanho de radícula (tabela 6 e gráfico 7), observados dentro da concentração de 2 g/L em condições de cultivo de estresse foram maiores para Sc e Cons. C que não diferiram e seguidos pelos da Cv. Dentro da concentração de 10 g/L, os resultados de Cons. C foram maiores aos da Cv e da Sc que não diferiram. Para a concentração de 20 g/L, a Cv os resultados foram menores aos da Sc e aos do Cons. C que não diferiram entre si. Nas condições de cultivo sem estresse não houve diferença entre os valores das espécies nas concentrações 2 e 10 g/L. Já na concentração 20 g/L, os resultados da aplicação do extrato de Cons. C foram maiores que os da Cv e os da Sc que não diferiram.

Nas condições de cultivo, com e sem estresse para concentração de 2 e 10 g/L os resultados da espécie Cv foram maiores no cultivo sem estresse, já os valores encontrados na aplicação dos extratos de Sc e do Cons. C não diferiram, com e sem condição de estresse. Na concentração de 20 g/L somente a espécie Sc apresentou resultados que diferiram nas diferentes condições de cultivo, sendo maior na condição normal de cultivo da microalga.

Os resultados da Cv relativos no tamanho de radícula dentro das diferentes concentrações, apresentaram valores maiores para concentrações de 10 e 20 g/L que não diferiram. Para a Sc e o Cons. C não foi observada diferença significativa entre os resultados nas diferentes concentrações. Dentro de cada espécie em condições de cultivo sem estresse, a Cv e a Sc apresentaram maiores resultados nas concentrações 2 e 10 g/L que não diferiram entre si. Já no Cons. C não foi observado diferenças significativas nos resultados.

Tabela 6 Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,18	Bb	1,70	Aa	1,28	Bb	1,68	Aa	1,35	Ba	1,30	Ba
Sc	1,58	Aa	1,53	Aa	1,45	Ba	1,70	Aa	1,63	Aa	1,23	Bb
Cons. C	1,50	Aa	1,60	Aa	1,63	Aa	1,83	Aa	1,70	Aa	1,58	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

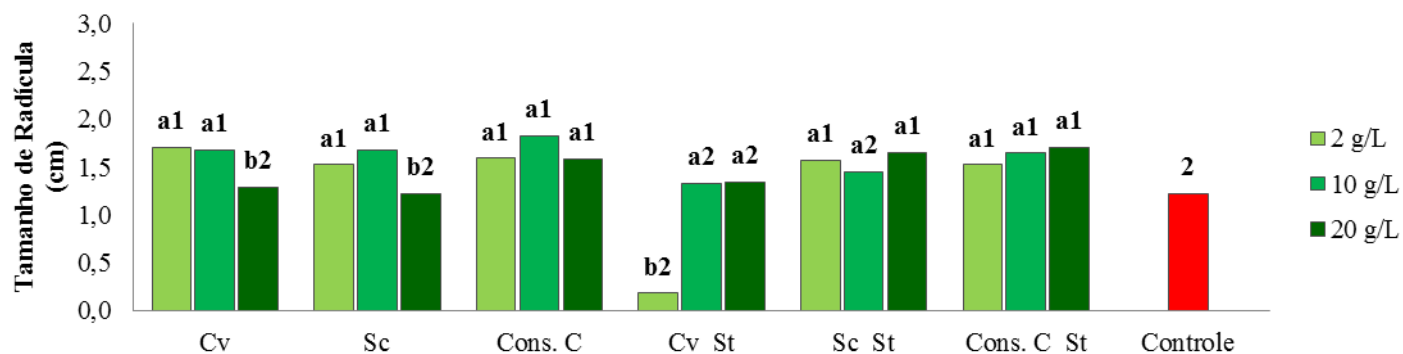


Gráfico 7 Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Os valores médios obtidos de tamanho de radícula foram superiores ao observado por Alves et al. (2004), avaliando efeito do extrato (0,1% v/v) de Alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.), e foi semelhante aos observados pelo mesmo autor para Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.) e Capim citronela (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.), na mesma concentração, o autor também relatou resultado superior quando aplicou extrato (0,1% v/v) de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf. ex. Wardleworth).

Andrade, Bittencourt e Vestena (2009), quando avaliou efeito do extrato (100% v/v) de Tiririca (*Cyperus rotundus* L.) encontrou valor de tamanho de radícula menor. Valores superiores foram relatados também por Gatti (2003), estudando as respostas da aplicação de extrato foliar (100% v/v) de *Histolochia esperanzae* e por Miranda et al. (2014), utilizando extrato de *Ambrosia polystachya* e *Parthenium hysterophorus*.

Silveira et al. (2004) relatou resultados semelhantes quando aplicado extrato de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze na concentração de 7,5% v/v e resultados superiores aplicando o mesmo extrato na concentração de (2,5% v/v). Os valores observados por Prichoa et al. (2013), também obteve valores semelhantes quando aplicado extrato de *Cyrtocarya moschata* e de *Ocotea odorifera* (0,25% v/v) e inferiores quando na concentração de 1% v/v.

Mano (2006) observou resultados semelhantes utilizando extrato de Cumaru (*Amburama cearenses* S.) na concentração de 0,19 mg/mL e menores quando extrato foi aplicado na concentração de 3,13 mg/mL.

Os resultados comparativos da aplicação dos diversos extratos comparados ao tratamento controle observa um efeito estimulante no desenvolvimento da radícula, visto que os resultados da aplicação da maioria dos extratos foram maiores que o resultado do tratamento controle.

4.2.1.5 Tamanho de hipocótilo (cm)

O tamanho de hipocótilo (tabela 7 e gráfico 8) apresentou os maiores resultados para o Cons. C, a Sc e a Cv, respectivamente, quando avaliados as microalgas cultivadas em condições de estresse na concentração de 2 g/L. Para a concentração de 10 g/L o maior valor foi obtido pela aplicação dos extratos das microalgas Sc e Cons. C que não diferiram entre si. Na concentração de 20 g/L o maior valor foi obtido para a Sc, seguido pela Cv e com o menor valor o Cons. C.

No sistema de cultivo sem condições de estresse na concentração de 2 e 10 g/L o resultado do Cons. C foi o menor valor quando comparado com os resultados da Cv e da Sc que não diferiram. Para a concentração e 20 g/L a Sc foi a que obteve o maior resultado de tamanho de hipocótilo. Dentro da Cv os resultados nas concentrações de 2 e 10 g/L não diferiram entre si e apresentaram valores maiores que na concentração de 20 g/L. Para a Sc e o Cons. C não houve diferença significativa nos resultados quando variou-se as concentrações.

Na comparação de condições de cultivo com e sem estresse na espécie Cv dentro da concentração 2 e 10 g/L os resultados da condição de cultivo com estresse foi menor ao sem estresse, na concentração de 20 g/L o resultado do cultivo com estresse foi maior ao do cultivo sem estresse. Para a Sc os resultados nas concentrações de 2 e 10 g/L não diferiram quando cultivadas sob condições de estresse e sem estresse, na concentração de 20 g/L o resultado de tamanho do hipocótilo no cultivo com estresse foi maior ao da biomassa sem estresse. Já para o Cons. C nas concentrações 2 e 20 g/L os resultados não apresentaram diferença nos cultivos com e sem estresse, e para a concentração de 10 g/L a biomassa proveniente do cultivo em condição de estresse o resultado foi maior do que o sem estresse.

Tabela 7 Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,08	Cb	2,93	Aa	2,55	Bb	3,13	Aa	3,00	Ba	2,60	Bb
Sc	2,88	Ba	3,13	Aa	3,08	Aa	3,00	Aa	3,45	Aa	3,10	Ab
Cons. C	3,23	Aa	2,68	Ba	2,95	Aa	2,63	Bb	2,58	Ca	2,83	Ba

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

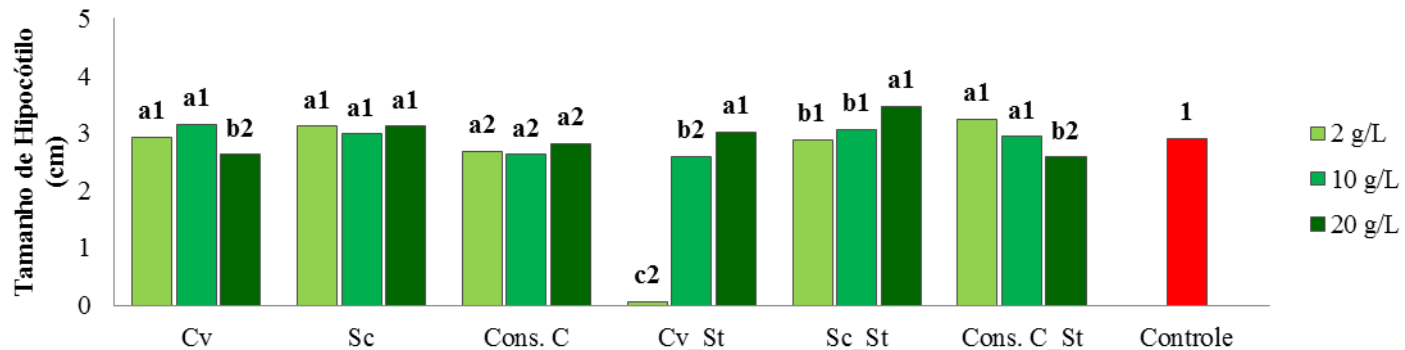


Gráfico 8 Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

A avaliação das concentrações dentro de cada espécie em condições de estresse, a Cv apresentou maior valor de tamanho de hipocótilo na concentração de 20 g/L, seguido pelo valor da concentração de 10 g/L e com o pior resultado para a concentração de 2 g/L. Na espécie Sc o maior resultado foi obtido pela concentração de 20 g/L quando comparado com os valores nas concentrações de 2 e 10 g/L que não diferem entre si. Já para o Cons. C os melhores resultados foram para as concentrações de 2 e 10 g/L que não diferem entre si.

Na avaliação do efeito da concentração do extrato dentro de cada microalga cultivada em condições sem estresse, foi observado para Cv maiores resultados nas concentrações de 2 e 10 g/L que não diferiram. Já para a Sc e o Cons. C não foi observado diferença significativa entre os resultados nas diferentes concentrações.

Os maiores valores, encontrados para o tamanho de hipocótilo, foram superiores aos observados por Miranda et al. (2014), utilizando extrato de *Ambrosia polystachya* e *Parthenium hysterophorus*. Foram superiores também aos relatados por Andrade, Bittencourt e Vestena (2009), aplicando extrato (100% v/v) de *Cyperus rotundus*, e aos observados por Gatti (2003) usando extrato de olhas (100% v/v) de *Aristolochia esperanzae*. Prichoa et al. (2013), também relatou valores menores de tamanho de hipocótilo estudando aplicação de extratos de *Cryptocarya moschata* e *Ocotea odorifera*.

4.2.1.6 Matéria seca total (mg)

Para avaliação do teor de matéria seca total (tabela 8 e gráfico 9), o valor obtido pelo extrato da Cv, cultivada em condições de estresse dentro da concentração de 2 g/L, foi menor que os da Sc que foi menor que os do Cons. C. Na concentração de 10 g/L os resultados da Cv e do Cons. C não diferiram e

foram maiores que os da Sc. Já para concentração de 20 g/L o valor de matéria seca do Cons. C foi maior que o da Cv que foi maior que os da Sc.

Nos extratos obtidos com biomassa cultivada sem condições de estresse na concentração de 2 g/L os resultados da Cv e da Sc não diferiram entre si e foram maiores que os do Cons. C. Para as concentrações de 10 e 20 g/L os valores da Sc apresentou a pior resposta quando comparada as encontradas para a Cv e pelo Cons. C que não diferiram entre si.

Quando comparados às condições de cultivo da microalga, com e sem estresse, na concentração 2 g/L os resultados da Cv e da Sc foram menores quando em cultivo com estresse, e os do Cons. C não apresentou diferença. Para concentração de 10 e 20 g/L as três microalgas não apresentaram diferenças significativas nos resultados quando cultivadas em condições com e sem estresse.

Dentro da matéria seca total os resultados do extrato da espécie Cv sob cultivo em condições de estresse foi menor na concentração 2g/L e as concentrações de 10 e 20 g/L não diferiram entre si. Para os resultados da Sc nas concentrações de 2 e 10 g/L não houve diferença e foram maiores que os valores encontrados para concentração de 20 g/L. No Cons. C não houve diferença entre os resultados das diferentes concentrações. Dentro da Cv e do Cons. C sem estresse quando comparadas a influência da concentração não houve diferença significativa nos resultados de matéria seca total. Já para a Sc o maior resultado foi obtido para menor concentração (2 g/L) e as concentrações de 10 e 20 g/L não apresentaram diferenças nos valores de matéria seca total.

Tabela 8 Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,00	Cb	27,38	Aa	25,70	Aa	26,13	Aa	23,40	Ba	25,03	Aa
Sc	22,78	Bb	27,25	Aa	20,38	Ba	21,70	Ba	18,20	Ca	20,00	Ba
Cons. C	27,08	Aa	24,23	Ba	24,33	Aa	24,88	Aa	27,43	Aa	24,60	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

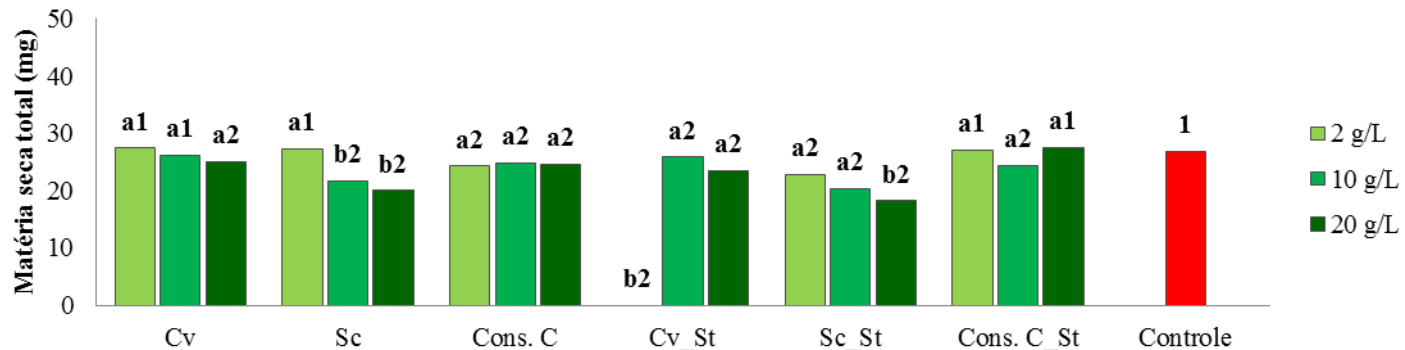


Gráfico 9 Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Os resultados de matéria seca total são derivados do somatório da matéria seca de todas as plântulas existente na amostra ao final da avaliação e portanto tem influencia direta do numero de sementes germinadas. Devido a esse fato as variações entre os tratamentos são semelhantes aquelas observadas no teste de germinação e diferentes dos resultados de porcentagem de matéria seca por plântula, onde se considera o peso médio das plântulas.

4.2.1.7 Matéria seca por plantula (mg)

No parâmetro avaliado de matéria seca por planta (tabela 9 e gráfico 10), o Cons. C apresentou maior valor quando avaliado o extrato preparado com biomassa advinda do cultivo em condições de estresse na concentração de 2 g/L, seguido pelo da Sc e com menor valor da Cv. Para as concentrações de 10 e 20 g/L não houve diferença significativa entre os resultados das microalgas. No cultivo da biomassa em condições sem estresse na concentração de 2 g/L a Sc apresentou maior resultado que a Cv e Cons. C que não diferiram entre si. Para concentração de 10 g/L os valores da Cv e da Sc não diferem e são maiores que os do Cons. C. Na concentração de 20 g/L não houve diferença entre os resultados.

Quando avaliados os resultados da aplicação dos extratos da mesma microalga dentro de cada concentração, comparando as condições de cultivo, com e sem estresse, para concentração de 2 g/L os resultados da Cv e da Sc foram maiores nas condições sem estresse, e no Cons. C não houve diferença.

Tabela 9 Resultados de matéria seca por planta (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,00	Cb	0,64	Ba	0,63	Ab	0,67	Aa	0,63	Aa	0,64	Aa
Sc	0,63	Bb	0,68	Aa	0,65	Aa	0,67	Aa	0,65	Aa	0,66	Aa
Cons. C	0,67	Aa	0,66	Ba	0,65	Aa	0,61	Bb	0,65	Aa	0,65	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

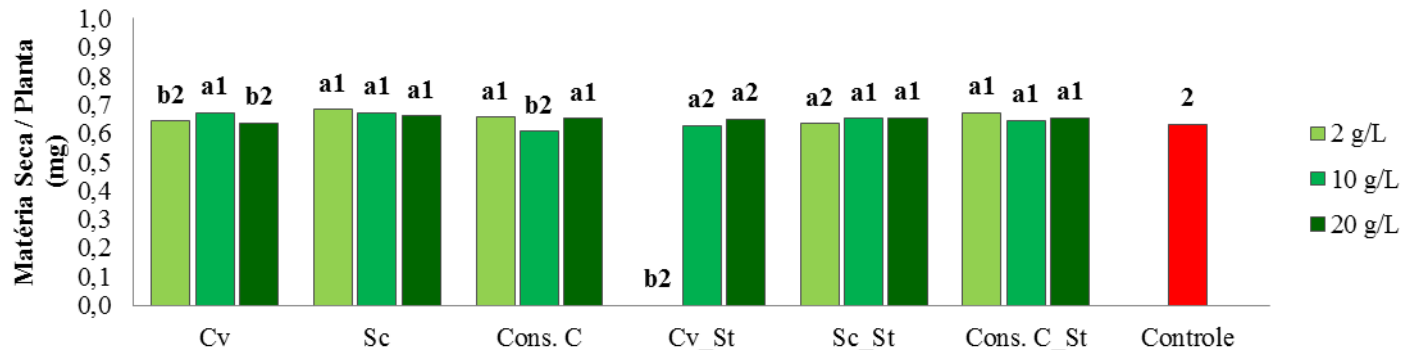


Gráfico 10 Resultados de matéria seca total por planta (mg), com aplicação de extrato aquoso em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Para concentração 10 g/L a Cv apresentou melhor resultado em condições de cultivo sem estresse, na Sc os resultados não apresentaram variação significativa e o Cons. C apresentou valor maior para cultivo em condições de estresse. Já na concentração de 20 g/L, os valores de matéria seca por planta nas microalgas não diferiram independente da condição de cultivo, com ou sem estresse.

Dentro de cada espécie em biomassa colhida do cultivo em condições de estresse, o resultado da Cv foi menor na concentração de 2 g/L comparado com os resultados de 10 e 20 g/L que foram maior e não diferiram entre si. Para Sc e Cons. C não houve diferença significativa nos resultados das diferentes concentrações.

Quando avaliadas cada microalga nas diferentes concentrações, a Cv obteve maior resultado na concentração de 10 g/L e os resultados das concentrações de 2 e 20 g/L não diferiram entre si. Para a Sc não houve variação significativa entre os valores nas diferentes concentrações. Já o Cons. para as concentrações de 2 e 20 g/L que não tiveram diferenças significativas nos resultados de matéria seca por planta e foram maiores que os da concentração de 10 g/L.

Os resultados da aplicação da maioria dos extratos foram maiores que os do tratamento controle o que não ocorre no parâmetro de matéria seca total, pois quando calculado o teor de matéria seca pela média das plântulas, nesse parâmetro, o vigor é mensurado pela capacidade da semente/plântula transformar reserva em matéria seca da estrutura da plântula..

4.2.2 Extrato metanólico

Os resultados da aplicação dos extratos preparados com metanol no teste de germinação de sementes de alface estão apresentados conforme os parâmetros

analisados, índice de velocidade de germinação, germinação final, germinação ao terceiro dia, tamanho de radícula, tamanho de hipocótilo, matéria seca total e matéria seca por planta.

4.2.2.1 Índice de velocidade de germinação – IVG (%)

A apresentação dos resultados da avaliação do IVG apresentada na tabela 10 e gráfico 11, dentro da concentração 2 e 20 g/L na biomassa de cultivo em condições de estresse foram maiores para Cv, seguido dos valores de IVG do Cons. C e da Sc. Na concentração de 10 g/L o resultado da Sc foi menor que o da Cv e o do Cons. C que não diferiram entre si. Para a biomassa obtida do cultivo sem estresse na concentração 2 e 10 g/L, os resultados não diferiram entre si, e na concentração de 20 g/L os valores da Cv e do Cons. C foram maiores que os encontrados pela Sc.

Na Cv quando comparado as condições de cultivo com e sem estresse, nas concentrações de 2 e 10 g/L não foi observado diferença significativa nos resultados de IVG, já para a concentração de 20 g/L a biomassa cultivada em condições de estresse apresentou resultado maior que o sem estresse. Para a Sc, nas três concentrações estudadas (2, 10 e 20 g/L), os valores do cultivo com estresse foram menores que os do cultivo sem estresse. Já no Cons. C nas concentrações de 2 e 20 g/L no cultivo em condições de estresse os resultados foram menores que do cultivo sem estresse, e na concentração de 10 g/L não houve diferença significativa nos resultados.

Tabela 10 Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	24,40	Aa	24,91	Aa	20,47	Aa	18,50	Aa	24,17	Aa	21,70	Ab
Sc	17,43	Cb	22,95	Aa	13,93	Bb	20,44	Aa	10,08	Cb	19,24	Ba
Cons. C	21,41	Bb	24,91	Aa	18,83	Aa	18,50	Aa	16,68	Bb	21,70	Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

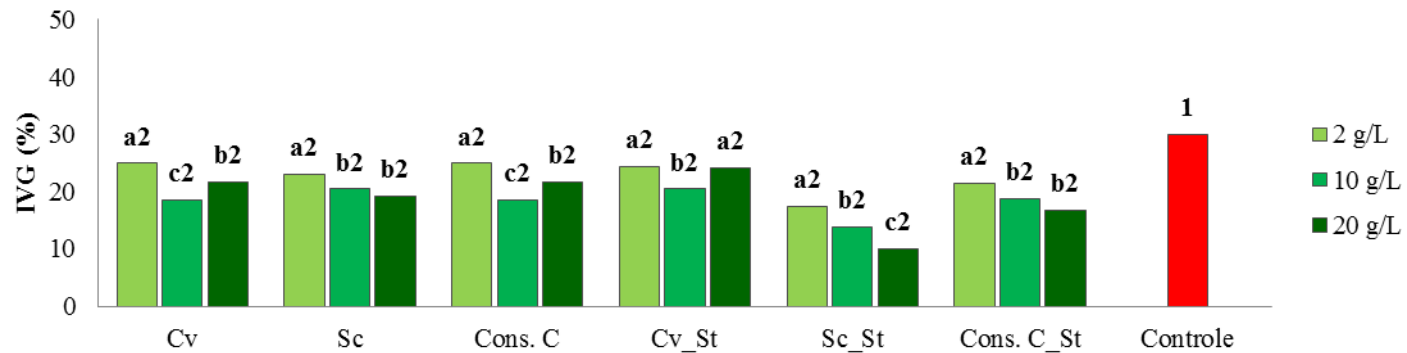


Gráfico 11 Resultados de índice de velocidade de germinação (%), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Quando comparado o efeito da concentração dentro de cada microalga foi observado que os resultados da avaliação de IVG dentro da Cv sem estresse foi maior na concentração de 2 g/L, seguido pelos da concentração de 20 g/L e o menor resultado foi encontrado na concentração de 10 g/L. Já em condições de estresse (St) nas concentrações de 2 e 20 g/L os resultados não diferiram entre si e foram maiores que os de 10 g/L.

Na Sc em condições sem estresse, o maior resultado de IVG foi na concentração de 2 g/L e nas concentrações de 10 e 20 g/L os resultados não diferiram entre si. Para o cultivo em condições de estresse o maior resultado foi encontrado na concentração de 2 g/L, seguido pelos da concentração de 10 e o menor resultado na concentração de 20 g/L.

O Cons. C sem estresse apresentou o maior resultado na concentração de 2 g/L, seguido pelo da concentração de 20 g/L e o menor resultado encontrado na concentração de 10 g/L. Em condições de estresse, o maior resultado foi na concentração de 2 g/L e nas concentrações de 10 e 20 g/L os resultados não diferiram entre si.

Os valores médios observados, para o índice de velocidade de germinação quando aplicado extrato metanólico, foram semelhantes aos observados por Souza et al. (1999), quando aplicado extrato de Capim jaraguá (*Hyparrhenia rufa*) e superiores aos encontrados pelos mesmos autores quando avaliaram o efeito de extrato de Mucuna (*Mucuna aterrima*), Capim colônia (*Panicum maximum*), Capim gordura (*Melinis minutiflora*) e Bambu (*Bambusa spp.*).

O valor de IVG para o tratamento controle foi maior que os demais resultados obtidos da aplicação de extratos metanólicos produzidos com biomassa das diferentes microalgas, indicando efeito de inibição na germinação de sementes.

4.2.2.2 Germinação final (%)

Na avaliação da porcentagem de germinação final houve significância na interação entre os resultados das microalgas e da condição de estresse (tabela 11). Dentro do cultivo em condição de estresse na Cv e no Cons. C os resultados não diferiram entre si e foram maiores que os da Sc. Já em condições de cultivo sem estresse os resultados não diferiram nas diferentes microalgas.

Tabela 11 Resultados de germinação final (%) na aplicação de extratos metanólicos das espécies *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consórcio C (Cons. C) em cultivos com (St) e sem estresse.

Algas	Estresse	
	Com (St)	Sem
<i>Chlorella vulgaris</i>	72,83 Aa	70,17 Aa
<i>Scenedesmus obliquuos</i>	57,50 Bb	72,50 Aa
Consorcio C.	72,83 Aa	70,17 Aa

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Na comparação do efeito do estresse, para Cv e Cons. C não foi observado diferença nos resultados do cultivo com e sem estresse, e para a Sc o resultado no cultivo sem estresse foi maior que o encontrado na condição de estresse.

Para a avaliação do efeito da variação da concentração do extrato (gráfico 12) foi observado o maior resultado na concentração de 2 g/L quando comparado aos das concentrações de 10 e 20 g/L que não diferiram.

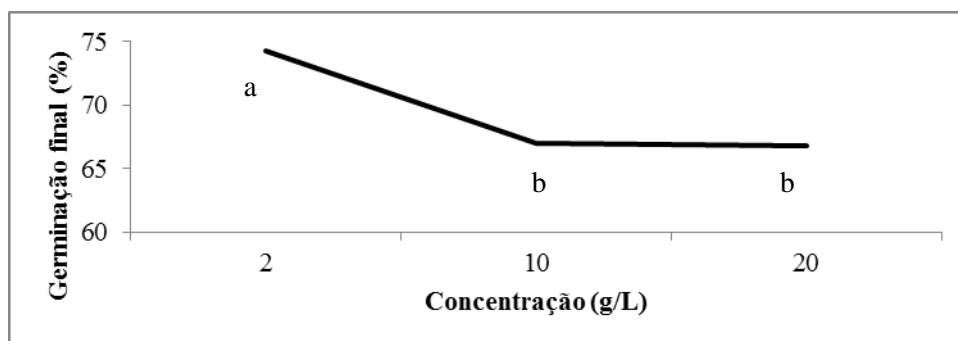


Gráfico 12 Resultados de germinação final (%) nas diferentes concentrações de extrato metanólico (2,10 e 20 g/L).

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Os resultados observados de germinação final quando da aplicação dos diversos extratos de microalgas foram menores que o observado pelo tratamento controle (gráfico 13), confirmando assim o efeito inibitório causado pelos extratos na germinação de sementes de alface.

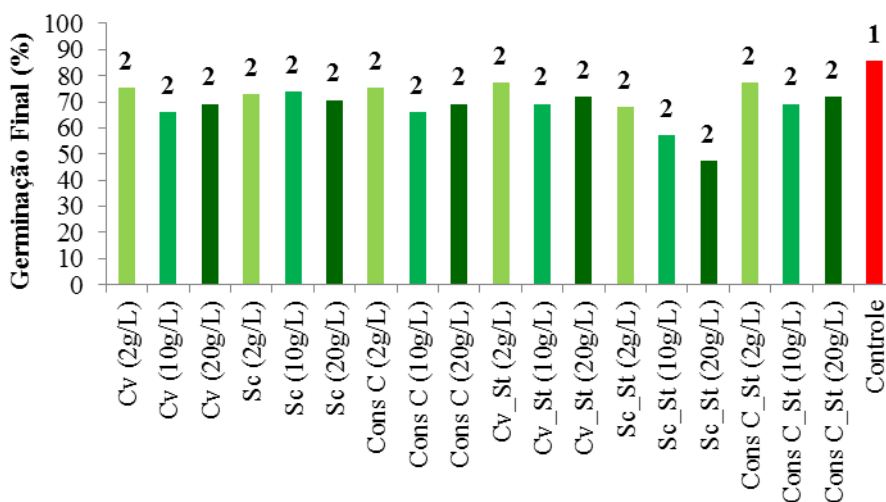


Gráfico 13 Resultados de germinação final (%) na aplicação de extratos metanólicos de microalgas, *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C e o tratamento controle.

*Médias seguidas pelos mesmos números não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

As maiores médias dos resultados observadas para germinação final foi menor aos resultados observados por Alves et al. (2004) estudando a aplicação de extrato aquoso nas concentrações de 0,001 e 0,010 % v/v de óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), capim-citronela (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) e jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf. ex. Wardleworth), também menor aos observados para extrato de folha seca de tiririca (*Cyperus rotundus*), nas concentrações de 10 e 100% v/v (ANDRADE; BITTENCOURT; VESTENA, 2009).

Já Bonfim (2007), observou valores semelhantes ao estudar o efeito da aplicação de extrato da folha de *Brachiaria decumbens* (100% v/v) e de *Melinis minutiflora* (50% v/v), e também os relatado por Periotto (2003) avaliando efeito do extrato do caule (16%) de *Andira Humilis* MART Ex. BENTH.

Valores inferiores aos observados foram relatados por Mano (2006), Prichoa et al. (2013), Silveira et al. (2014) e Souza et al. (1999), estudando respectivamente, extratos de Cumaru (*Amburama cearenses* S.), 3,13 mg/mL, *Cryptocarya moschata* (1% v/v), *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (7,5% v/v) e *Mucuna aterrima*, 25% v/v.

4.2.2.3 Germinação ao terceiro dia (%)

Os resultados de germinação ao terceiro dia na interação significativa entre as microalgas e a condição de cultivo com e sem estresse (tabela 12) não diferiram no cultivo em condição de estresse para Cv e Cons. C e foram maiores que os valores para Sc. Já em condições de cultivo sem estresse não foi observado diferença significativa entre os resultados das diferentes microalgas. Na comparação do efeito do estresse, para Cv e Cons. C não foi observado diferença nos resultados do cultivo com e sem estresse, e para a Sc os valores de

germinação ao terceiro dia no cultivo sem estresse foram maiores que os encontrados em condições de estresse.

Tabela 12 Resultados de germinação ao terceiro dia (%) na aplicação de extratos metanólicos das espécies *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consórcio C (Cons. C) em cultivos com e sem estresse.

Algas	Estresse	
	Com	Sem
<i>Chlorella vulgaris</i>	63,92 <i>Aa</i>	64,00 <i>Aa</i>
<i>Scenedesmus obliquuos</i>	45,17 <i>Bb</i>	62,42 <i>Aa</i>
Consorcio C.	60,92 <i>Aa</i>	64,00 <i>Aa</i>

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Quando avaliado a interação entre as concentrações e as microalgas (tabela 13), observou-se que os resultados nas concentrações de 2 e 20 g/L para Cv e Cons. C os valores foram maiores que os da Sc e na concentração de 10 g/L não houve diferença significativa entre os resultados das microalgas. Quando analisado os resultados da Cv foram observados os maiores valores nas concentrações de 2 e 20 g/L que não diferiram entre si. Para a Sc os resultados encontrados para as concentrações de 2 e 10 g/L não diferem entre si e foram maiores que os da concentração de 20 g/L. No Cons. C os valores encontrados nas concentrações de 10 e 20 g/L não diferiram entre si e foram menores que o da concentração de 2 g/L.

Tabela 13 Resultados de germinação ao terceiro dia (%) na aplicação de extratos metanólicos das espécies *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consórcio C (Cons. C) nas concentrações de 2, 10 e 20 g/L.

Algas	Concentração (g/L)		
	2	10	20
<i>Chlorella vulgaris</i>	68,63 Aa	57,25 Ab	66,00 Aa
<i>Scenedesmus obliquus</i>	58,63 Ba	55,38 Aa	47,38 Bb
Consorcio C.	69,38 Aa	56,00 Ab	62,00 Ab

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Observa-se no gráfico 14 o efeito negativo na germinação inicial das sementes quando aplicado os extratos produzidos de biomassa microalgal quando comparados com os resultados do tratamento controle, reforçando o efeito de inibição dos extratos nos processos germinativos.

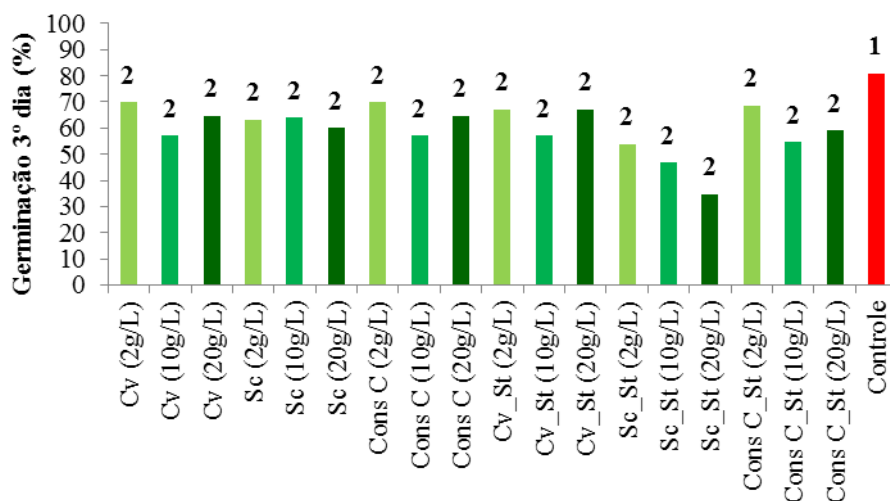


Gráfico 14 Resultados de germinação ao terceiro dia (%) na aplicação de extratos metanólicos de microalgas, *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C e o tratamento controle.

*Médias seguidas pelos mesmos números não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

4.2.2.4 Tamanho de radícula (cm)

A avaliação de tamanho de radícula (tabela 14 e gráfico 15), os resultados dentro da concentração 2 e 10 g/L, com condição de estresse, os valores da Cv não diferiu dos do Cons. C e foram maiores que os da Sc. Na concentração de 20 g/L na mesma condição de estresse, o valor obtido pela Cv foi maior que o da Sc e do Cons. C que não se diferiram entre si.

Para a condição de cultivo sem estresse, na concentração 2 g/L não foram observadas diferenças significativas entre os resultados das microalgas. Para a concentração de 10 g/L o Cons. C obteve resultados maiores que os da Cv e da Sc que não diferiram. Na concentração de 20 g/L o maior valor encontrado foi para Sc, seguido da Cv e o menor valor observado para o Cons. C.

Na comparação do efeito da condição de estresse (com e sem), na concentração de 2 g/L os resultados das diferentes microalgas não apresentaram diferença significativa com e sem estresse, já na concentração 10 g/L para Cv o maior valor observado foi em condição de estresse, para a Sc a condição de cultivo sem estresse apresentou maior resultado de tamanho de radícula e o Cons. C não apresentou diferença significativa em seus resultados. Para a concentração de 20 g/L para Cv e Cons. C os resultados do cultivo com estresse foram maiores que os sem estresse e para a Sc a condição de estresse os valores encontrados foram menores que os sem estresse.

Tabela 14 Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	1,83	Aa	1,78	Aa	2,08	Aa	1,53	Bb	1,83	Aa	1,48	Bb
Sc	1,58	Ba	1,53	Aa	1,00	Bb	1,33	Ba	1,58	Bb	1,83	Aa
Cons. C	1,80	Aa	1,68	Aa	2,00	Aa	1,93	Aa	1,60	Ba	0,63	Cb

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

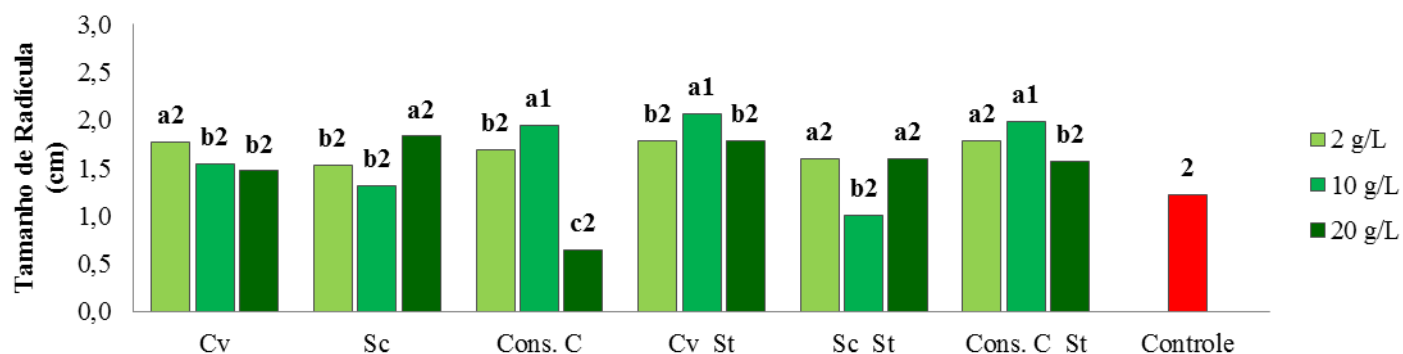


Gráfico 15 Resultados de tamanho de radícula (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

No efeito da variação da concentração dos extratos, o maior resultado observado para Cv foi na concentração de 2 g/L, para condição de cultivo sem estresse, já em condições de estresse o maior valor de tamanho de radícula foi observado na concentração de 10 g/L. Para a Sc sem condição de estresse o maior valor foi observado na concentração de 20 g/L, e em condições de estresse a concentração de 10 g/L obteve o menor valor. Os resultados do Cons. C foram maiores na concentração de 10 g/L, seguidos pelos da concentração de 2 g/L e o menor resultado observado na concentração de 20 g/L, nas condições de cultivo sem estresse, já em condições de estresse os resultados das concentrações de 2 e 10 g/L não diferiram e foram maiores que os de 20 g/L.

Nos resultados de tamanho de radícula quando da aplicação da maioria dos extratos, observou-se comportamento estimulante no desenvolvimento da radícula, quando comparados com o tratamento controle.

As maiores médias observadas de tamanho de radícula foram semelhantes aos observados por Alves et al. (2004) estudando a aplicação de extrato aquoso na concentração de 0,001% v/v de óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), capim-citronela (*Cymbopogum citratus* (DC) Stapf.) e jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf. ex. Wardleworth). Esses valores foram menores aos observados por Andrade, Bittencourt e Vestena (2009), utilizando extrato aquoso de Tiririca (*Cyperus rotundus*), 10% v/v; Gatti (2003), aplicando extrato aquoso (50% v/v) de folhas de *Aristolochia esperanzae*; Prichoa et al. (2013), no uso de extratos (1% v/v) de *Cryptocarya moschata* e *Ocotea odorífera* e Silveira et al. (2014), estudando aplicação de extrato de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.

4.2.2.5 Tamanho de hipocótilo (cm)

Para o tamanho do hipocótilo (tabela 15 e gráfico 16) os resultados não diferiram quando avaliado as diferentes microalgas na concentração de 2 g/L em condições de estresse. Para a concentração de 10 g/L, na mesma condição com estresse, o resultado da Cv foi maior, seguido dos do Cons. C e o menor valor para a Sc. Na concentração de 20 g/L os resultados da Sc e do Cons. C não diferiram e os resultado foram maiores que os encontrados para Cv. Em condições de cultivo sem estresse, nas três concentrações, os resultados da Cv e da Sc não diferiram e foram maiores que os valores do Cons. C.

Na concentração de 2 g/L, quando as microalgas foram comparadas quanto as diferenças dos valores de tamanho de hipocótilo nas condições de cultivo, com e sem estresse, a Cv e a Sc não apresentaram diferenças e no Cons. C o cultivo com estresse obteve maior resultado que no cultivo sem estresse. Os resultados na concentração de 10 g/L, da Cv e do Cons. C em cultivo com estresse foi maior que os do cultivo sem estresse, e para Sc não diferiram. Com a concentração de 20 g/L, os resultados de tamanho de hipocótilo da aplicação do extrato da biomassa da Cv cultivada em condições de estresse foi menor que da biomassa sem estresse, os da Sc não diferiram e do Cons. C os valores do extrato de biomassa em condições de estresse foi maior que os sem estresse.

Tabela 15 Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	2,90	Aa	2,88	Aa	3,40	Aa	2,73	Ab	2,58	Bb	3,10	Aa
Sc	2,90	Aa	2,85	Aa	2,63	Ca	2,70	Aa	2,88	Aa	2,90	Aa
Cons. C	3,00	Aa	2,48	Bb	2,93	Ba	2,45	Bb	3,10	Aa	1,13	Bb

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

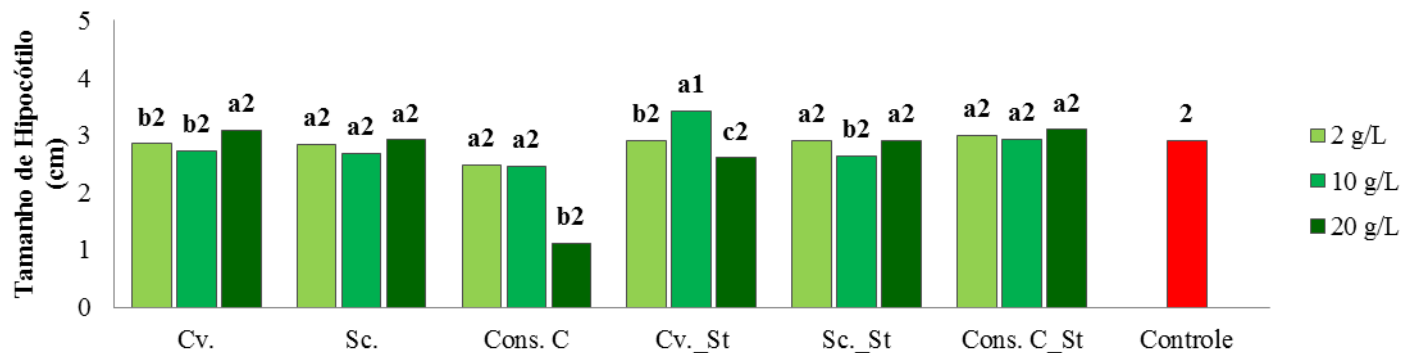


Gráfico 16 Resultados de tamanho de hipocótilo (cm), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Os resultados, da influência das diferentes concentrações, da Cv sem estresse foram maiores na concentração de 20 g/L, e com estresse foi maior na concentração de 10 g/L, seguido pela concentração de 2 g/L e o menor valor na concentração de 20 g/L. Para a Sc não foi observado diferença significativa nos resultados das diferentes concentrações da biomassa no preparo dos extratos em condições sem estresse, já para a biomassa cultivada com estresse, os resultados das concentrações de 2 e 20 g/L não diferiram e foram os maiores resultados. Já os valores de tamanho de radícula na aplicação de extrato do Cons. C sem estresse nas concentrações de 2 e 10 g/L foram maiores e com estresse não diferiram.

As maiores médias variam de 3,10 – 3,40 cm, e Andrade, Bittencourt e Vestena (2009) reportou valores maiores, na aplicação de extrato aquoso de *Cyperus rotundus* (10% v/v). Os mesmos autores utilizando o mesmo extrato na concentração de 100% v/v, observou resultados menores de tamanho de hipocótilo. Os resultados encontrados na aplicação de extrato de folhas (50% v/v) de *Aristolochia esperanzea* também foram menores (GATTI, 2003). Mano (2006), também observou valores menores aos obtidos quando aplicou extrato de Cumaru (*Amburama cearenses* S.).

4.2.2.6 Matéria seca total (mg)

Na avaliação dos resultados de matéria seca total (tabela 16 e gráfico 17), os resultados da aplicação de extrato da biomassa cultivada em condições de estresse, os valores dos extratos das diferentes microalgas comportaram da mesma forma nas diferentes concentrações, os da Cv e do Cons. C não diferiram entre si e foram maiores que os da Sc. Para a biomassa cultivada em condições sem estresse na concentração 2 g/L os resultados das diferentes microalgas não

diferiram, já para as concentrações de 10 e 20 g/L os resultados da Sc foram maiores que da Cv e do Cons. C que não diferiram.

Dentro da concentração de 2 g/L, para comparação entre os resultados de matéria seca total das biomassas cultivadas em condições com e sem estresse, não foi observado diferenças significativas. Na concentração de 10 g/L, os resultados da Cv com estresse foi maior que o sem estresse, para Sc com estresse os resultados foram menores que os sem estresse e no Cons. C não foi observado diferenças significativas nos valores de matéria seca total. Na concentração de 20 g/L, para o extrato da Cv e do Cons. C em condições de estresse os resultado foram maiores que os do extrato de biomassa cultivada sem estresse. Já os resultados da Sc em cultivo sem estresse foi maior que os do cultivo com estresse.

Avaliando a variação dos resultados das diferentes concentrações dos extratos dentro de cada microalga, os da Cv e do Cons. C em condições de estresse e os da Sc sem estresse não diferiram. Para os resultados do efeito do extrato da Sc com estresse na concentração 2 e 10 g/L não diferiram e foram maiores que os da concentração de 20 g/L. Já para os resultados de matéria seca total do extrato da Cv e do Cons. C sem estresse o maior valor foi observado na concentração de 2 g/L, e os valores das concentrações de 10 e 20 g/L não diferiram entre si.

Para a aplicação dos extratos metanólicos o comportamento dos resultados de matéria seca total é semelhante aos observados pelo parâmetro de germinação final, confirmando que esse parâmetro é influenciado pela germinação das sementes.

Tabela 16 Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	25,33	Aa	24,33	Aa	22,90	Aa	19,30	Bb	23,90	Aa	18,48	Bb
Sc	21,78	Ba	24,23	Aa	18,78	Bb	26,40	Aa	14,63	Bb	23,60	Aa
Cons. C	25,10	Aa	26,48	Aa	21,88	Aa	22,43	Ba	24,18	Aa	20,63	Bb

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

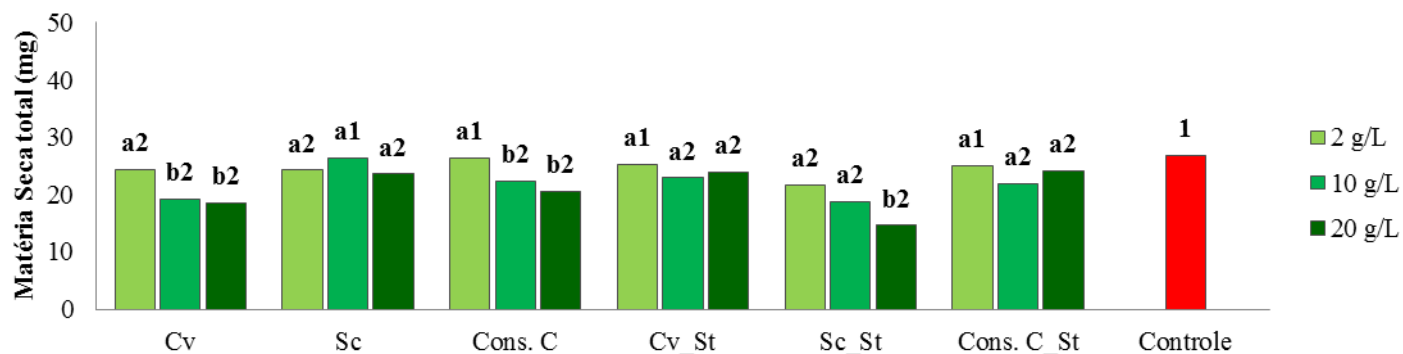


Gráfico 17 Resultados de matéria seca total (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomássas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

4.2.2.7 Matéria seca por plantula (mg)

Os resultados de matéria seca por plantula (tabela 17 e gráfico 18) para concentração de biomassa com e sem estresse no extrato de 2 g/L e biomassa com estresse na concentração 10 g/L não houve diferenças nos resultados nas diferentes microalgas. Para a concentração de 10 g/L sem estresse os resultados da Sc e do Cons. C foram maiores e não diferiram entre si. Para concentração de 20 g/L com estresse os valores de matéria seca por planta do extrato da Cv e do Cons. C não diferiram entre si e foram maiores que os da Sc. Já na mesma concentração sem estresse os resultados da Sc foram maiores, seguidos pelos do Cons. C e os menores para Cv.

Na concentração de 2 g/L dentro da Cv e da Sc os resultados não diferiram quando extrato foi preparado da biomassa com e sem estresse. Nos resultados da aplicação do extrato de Cons. C sem estresse foram maiores quando comparados com o extrato preparado da biomassa em condições de estresse. Para a concentração de 10 g/L os resultados do extrato da Cv foram maiores quando utilizado a biomassa cultivada em condições de estresse, e para os do extrato da Sc em condições de estresse os resultados foram menores que os do extrato da biomassa sem estresse, já os resultados do extrato do Cons. C não diferiram. Dentro da concentração de 20 g/L os resultados de matéria seca por planta da aplicação do extrato da Cv e do Cons. C foram maiores quando a biomassa utilizada foi cultivada em condições de estresse, e para os da Sc foi menor quando comparando com o uso da biomassa sem estresse.

Tabela 17 Resultados de matéria seca por plantula (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

	2 g/L				10 g/L				20 g/L			
	Com (St)		Sem		Com (St)		Sem		Com (St)		Sem	
Cv	0,65	Aa	0,65	Aa	0,66	Aa	0,59	Bb	0,66	Aa	0,54	Cb
Sc	0,64	Aa	0,67	Aa	0,66	Ab	0,72	Aa	0,61	Bb	0,67	Aa
Cons. C	0,65	Ab	0,70	Aa	0,63	Aa	0,68	Aa	0,67	Aa	0,59	Bb

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

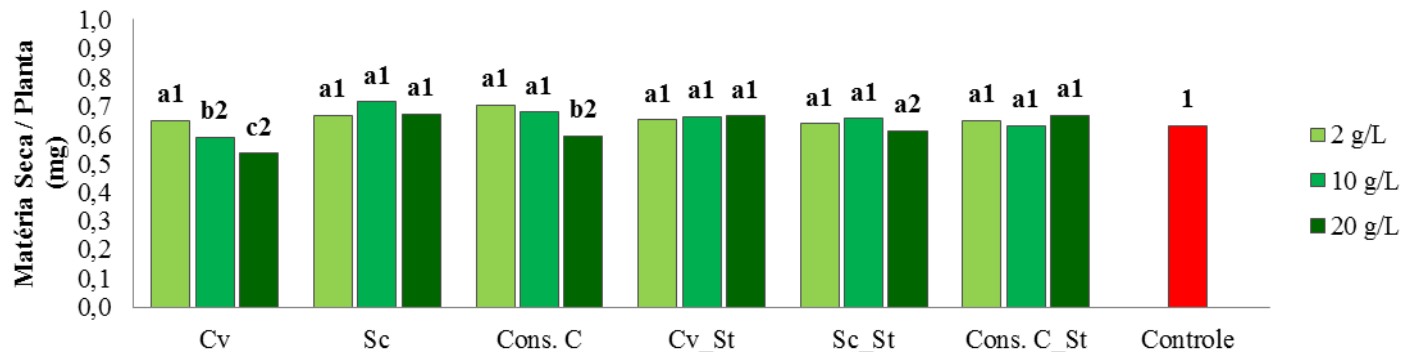


Gráfico 18 Resultados de matéria seca por plantula (mg), com aplicação de extrato metanólico em três concentrações (2,10 e 20 g/L) de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consorcio C (Cons. C), cultivadas em condições com (St) e sem estresse.

*As médias seguidas pelo mesma letra em cada extrato das diferentes biomassas e com mesmo número quando todas são comparadas ao tratamento controle não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

Quando avaliado as diferentes concentrações dentro de cada microalga, os resultados do extrato preparado com biomassa da Cv em cultivo com estresse foi maior quando utilizado a concentração de 2 g/L de biomassa, seguido pelo extrato na concentração de 10 g/L e o menor no extrato de 20 g/L.

No extrato preparado de Sc os resultados não diferiram na variação da concentração dos extratos. Já para os resultados da aplicação do extrato do Cons. C nas concentrações de 2 e 10 g/L não diferiram e foram maiores que os da concentração de 20 g/L. Nos extratos preparados com biomassas cultivadas em condições de estresse a variação da concentração do extrato não diferiu nos resultados de matéria seca por planta.

Os resultados da aplicação da maioria dos extratos metanólicos para matéria seca por planta foram semelhantes ao resultado observado para o tratamento controle. O comportamento dos resultados do parâmetro matéria seca por planta difere do comportamento dos resultados observados para matéria seca total da mesma forma que ocorreu no extrato aquoso.

5 CONCLUSÃO

As biomassas das microalgas apresentam variações na caracterização bioquímica quando submetidas a condições de cultivo com estresse.

O perfil dos ácidos graxos das microalgas apresentam maiores teores de ácidos graxos insaturados, exceto para Sc que apresenta maior teor de ácido graxo saturado.

A aplicação dos extratos aquosos de Cv, Sc, CvSt, ScSt e Cons C St apresentam efeito inibitório quando avaliando parâmetro IVG. E tem efeito estimulante em crescimento de radícula para os extratos da microalga Cons C e Cons C St.

A aplicação do extrato aquoso da Sc e ScSt apresenta efeito inibitório dos parâmetros de germinação (IVG, germinação final e germinação ao terceiro dia) diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato.

Os extratos aquosos, nas três concentrações, preparados com as biomassas microalgais com e sem estresse não apresentam diferença na germinação final, exceto para Cv (2 g/L).

Todos os extratos metanólicos apresentam efeito inibitório do IVG, da germinação final e germinação do terceiro dia.

O aumento da concentração do extrato metanólico diminui os valores de germinação final.

Os extratos metanólicos preparados com as biomassas microalgais de Cv e Cons C com e sem estresse não apresentam diferença na germinação final e germinação ao terceiro dia.

O aumento da concentração do extrato metanólico de Cv diminui o teor de matéria seca por plantula.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, A. E.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I., algal strains and nutrient supply. **Environmental Technology**, London, v. 34, n. 13/14, p. 1783-1805, 2013.
- ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, nov. 2004.
- ANDRADE, H. M.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1984-1990, 2009. Edição especial.
- ANTELO, F. S. et al. Extraction and purification of Cphycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 921-926, 2010.
- ARBIB, Z. et al. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. **Water Research**, New York, v. 49, p. 465-474, Feb. 2014.
- ARDELAN, I.; ZARNEA, G. Photosynthesis respiration interplay in cyanobacteria: fundamentals and application. In: SUBRAMANIAN, G.; KAUSHIK, B. D.; VENKATARAMAN, G. S. (Ed.). **Cyanobacterial biotechnology**. Enfield: Science, 1998. p. 103-107.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 64-70, Nov. 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Arlington, 2006.
- BAI, M. et al. Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Taipei, v. 42, n. 5, p. 783-786, Sept. 2011.

BASTOS, R. G. et al. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 5, n. 3, p. 258-264, 2010.

BASTOS, R. G. et al. Growth of cyanobacteria *Aphanothece sp.* on exogenous sugars. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 156-161, 2011.

BASTOS, R. G. et al. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 112-116, 2004.

BATISTA, A. P. et al. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production: an integrated microalgae-based approach. **Bioresource Technology**, Essex, v. 184, p. 230-235, May 2015.

BATISTA, A. P. et al. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, New York, v. 2, n. 2, p. 164-173, Mar. 2013.

BOCK, C.; KRIENITZI, L.; PRÖSCHOLD, T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. **Fottea**, Praha, v. 11, n. 2, p. 293-312, Jan. 2011.

BONFIM, D. C. **Alterações no desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. e *Dalbergia miscolobium* Benth produzidas por extratos de folhas de *Brachiaria decumbens* Stapf e *Melinis minutiflora* Beauv.** 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

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

BREUER, G. et al. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, Essex, v. 124, p. 217-226, Nov. 2012.

- BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 315-331, May 1997.
- CASTRO, G. S. A. et al. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1311-1318, out. 2008.
- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132 p.
- CHEN, C. Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 71-81, Jan. 2011.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, Dickson, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.
- CHU, F. et al. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource Technology**, Essex, v. 152, p. 241-246, Jan. 2014.
- CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Lausanne, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, June 2009.
- 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: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: UCS, 2011. 1 CD-ROM.
- DASGUPTA, C. N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, n. 19, p. 10218-10238, Oct. 2010.
- DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, Mar. 2010.

DEL CAMPO, J. A. et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 51-59, Jan. 2000.

DOURADO NETO, D. et al. Aplicação e influência do fito regulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 93-102, 2004.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 360-356, 1956.

DUMAS, A. et al. Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Aquacultural Engineering**, London, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1998.

EINHELLING, F. A.; SCHON, M. K.; RASMUSSEM, J. A. Sinergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. **The Plant Journal**, York, v. 4, p. 251-258, 1982.

EUROPEAN STANDARD. **European Standard EN 14103**: fat and oil derivatives: fatty acid methyl esters (FAME): determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Brussels, 2003. 16 p.

FAY, P. **The blue-greens (Cyanophyta-cyanobacteria)**. London: E. Arnold, 1983. 88 p.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 56, n. 2, p. 340-373, 1992.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 175-204, 2000. Edição especial.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Sociedade Internacional de Biometria, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, L. A. et al. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 80-89, ago. 2007.

GABOR, W. E.; VEATCH, C. Isolation of phytotoxin from quackgrass (*Agropyron repens*) rhizomes. **Weed Science**, Champaign, v. 29, p. 155-159, 1981.

GATTI, A. B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorífera* (Vell) Rohwer na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** 2003. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

GONZÁLES, L. E.; CANIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, New York, v. 60, n. 3, p. 259-262, June 1997.

GOUVEIA, L.; EMPIS, J. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, London, v. 4, n. 2, p. 227-233, June 2003.

GOUVEIA, L. et al. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n. 2, p. 157-163, Aug. 1996.

GOUVEIA, L. et al. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 36, n. 6, p. 821-826, Apr. 2009.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 36, n. 2, p. 269-274, Nov. 2009.

GRZESIK, M.; ROMANOWSKA-DUDA, Z. Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with Cyanobacteria and Microalgae. **Polish Journal of Environmental Studies**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 1147-1153, 2014.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, Apr. 2010.

HARUN, R. et al. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 741-747, Jan. 2011.

HE, P. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 129, p. 177-181, Feb. 2013.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina***: superalimento del futuro. Barcelona: Urano, 1994. 222 p.

HEREDIA-ARROYO, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 2245-2253, May 2011.

HERNANDEZ, J.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, n. 1/2, p. 190-198, Jan. 2006.

HO, S.; CHEN, C.; CHANG, J. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNWN. **Bioresource Technology**, Essex, v. 113, p. 244-252, June 2012. Special issue.

HODAIFA, G.; MARTINEZ, M. E.; SANCHEZ, S. Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium. **Engineering in Life Sciences**, New York, v. 10, n. 3, p. 257-264, June 2010.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, London, v. 87, n. 1, p. 38-46, Jan. 2010.

HUNTLEY, M. E.; REDALJE, D. G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, New York, v. 12, n. 4, p. 573-608, May 2007.

JACOB-LOPES, E. et al. Protein characterization of the *Aphanothece microscopica* Nägeli cyanobacterium cultivated in parboiled rice effluent. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 482-488, 2006.

- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; FRANCO, T. T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 47, n. 8, p. 1365-1373, Aug. 2008.
- JI, M. et al. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production. **Ecological Engineering**, New York, v. 58, p. 142-148, Sept. 2013.
- JONES, D. B. **Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins**. Washington: USDA, 1931. 28 p. (National Agricultural Library, 183).
- KESSLER, E. Scenedesmus: problems of a highly variable genus of green algae. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 104, n. 3, p. 169-171, June 1991.
- KIM, J. et al. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua*. **Science and Technology**, Beijing, v. 15, n. 4, p. 391-396, 2010.
- KOMÁREK, J.; HAUER, T. **The on-line database of cyanobacterial genera**. Bohemia: University of South Bohemia; Institute of Botany AS CR, 2011. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz>>. Acesso em: 3 out. 2011.
- KURANO, N. et al. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 36, n. 6/9, p. 689-692, 1995.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 3, p. 673-690, May/June 2012.
- LI, Y. et al. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, New York, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CU, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, Wageningen, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, July 2009.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

LU, J.; TAKEUCHI, T.; SATOH, H. Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1/4, p. 437-449, Sept. 2004.

LUBIÁN, L. M. et al. *Nannochloropsis (Eustigmatophyceae)* as source of commercially valuable pigments. **Journal of Applied Phycology**, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 249-255, Oct. 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, Jan./Feb. 1962.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 2, p. 281-291, Aug. 2009.

MANO, A. R. O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de Cumaru (*Amburana cearenses* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. 2006. 102 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p.

MARQUES, A. et al. Microalgae biotechnological applications: nutrition, health and environment. In: _____. **Microalgae: biotechnology, microbiology and energy**. New York: New Science, 2011. p. 1-60.

MARTINEZ, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 73, n. 3, p. 263-272, July 2000.

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

MCDONALD, M. D.; KHAN, A. A. Acid scarification and protein synthesis during seed germination. **Agronomy Journal**, Madison, v. 2, n. 75, p. 111-114, 1983.

- MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 6, p. 841-846, Apr. 2006.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Chemical composition and allelopathic activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* weeds essential oils. **American Journal of Plant Sciences**, Dover, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, Apr. 2014.
- MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 104, p. 342-348, Jan. 2012.
- MOAZAMI, N. et al. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 39, p. 449-453, Apr. 2012.
- MONTERO, M. F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G. G. Isolation of high-lipid content strains of the marine Microalgae *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. **Journal of Applied Phycology**, Copenhagen, v. 23, n. 6, p. 1053-1057, Dec. 2011.
- MULBRY, W. et al. Treatment of dairy manure effluente using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 17, p. 8137-8142, Nov. 2008.
- NOBRE, B. et al. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga: extraction of oils and pigments: production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology Special Issue: Biorefinery**, Essex, v. 135, p. 128-136, May 2013.
- NOBRE, B. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 223, n. 6, p. 787-790, Oct. 2006.
- ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; SANTOS, S. O. Efeito de fitorreguladores sobre o desenvolvimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Carioca. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 5, n. 1, p. 7-13, 1999.
- PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 35-42, Jan. 2011.

PASQUALINO, J. C.; MENESES, M.; CASTELLS, F. Life cycle assessment of urban wastewater reclamation and reuse alternatives. **Journal of Industrial Ecology**, London, v. 15, n. 1, p. 49-63, Feb. 2011.

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

PERIOTTO, F. **Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex. Benth e *Anacardium humile* na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** 2003. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

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

POWELL, E. E.; HILL, G. A. Economic assessment of an integrated bioethanol-biodiesel-microalgal fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. **Chemical Engineering Research and Design**, Elmsford, v. 87, n. 9, p. 1340-1348, Sept. 2009.

PRICHOA, F. C. et al. Comparative allelopathic effects of *Cryptocarya moschata* and *Ocotea odorífera* aqueous extracts on *Lactuca sativa*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 2, p. 197-202, Apr./June 2013.

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

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

QUEIROZ, M. I. et al. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, n. 11, p. 2163-2169, 2007.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 3, n. 6, p. 889-900, June 2003.

QUEIROZ, M. I. et al. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, London, v. 88, n. 10, p. 3438-3443, Oct. 2011.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, London, v. 103, p. 444-467, Mar. 2013.

RUZENE, D. S. et al. An alternative application to the portuguese agro-industrial residue: wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 147, n. 1/3, p. 85-96, Mar. 2008.

SAMPIETRO, D. A. **Alelopatía**: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Disponível em:
<<http://www.biologia.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>>. Acesso em: 5 ago. 2001.

SANTOS, C. M. G.; VIEIRA, E. L. Efeito de bioestimulante na germinação de grãos, vigor de plântulas e crescimento inicial do algodoeiro. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 124-130, jul./set. 2005.

SHI, X. M. et al. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations. **Process Biochemistry**, Barking, v. 34, n. 4, p. 341-347, June 1999.

SILVA, T. T. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho na presença de bioestimulantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 840-846, maio/jun. 2008.

SILVEIRA, B. D. et al. Atividade alelopática de *Araucaria angustifolia* (bertol.) kuntze na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 79-85, jan./mar. 2014.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 26-34, Jan. 2011.

SOARES, G. L. G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 7, n. 1, p. 190-197, 2000.

SOUZA, C. L. M. et al. Efeito inibidor dos extratos hidroalcoólicos de coberturas mortas sobre a germinação de sementes de cenoura e alface. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 263-272, maio/ago. 1999.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, n. 2, p. 87-96, Feb. 2006.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochemistry Biophysics Acta**, Nijmegen, v. 1740, n. 2, p. 101-107, May 2005.

STANKIEWICZ, E. H.; ANDRADE, L. F.; DOMINGUES, L. L. **Levantamento ficológico do Rio Iguaçu**: algas unicelulares I. Curitiba: SURHEMA, 1981. 76 p.

STARR, R.; ZEIKUS, J. UTEX-the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 29, n. S2, p. 1-106, Apr. 1993. Supplement.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, Amherst, v. 107, n. 1, p. 145-151, Jan. 2000.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture**. Oxford: Blackwell, 2004. p. 3-19.

TRAVIESOA, L. et al. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, New York, v. 28, n. 2, p. 158-165, Nov. 2006.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A. Microalgae as source of biofuel, food, fodder and medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 9, p. 789-807, 2011.

WANG, L. et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. **Bioresource Technology**, Essex, v. 129, p. 289-295, Feb. 2013.

WEAVER, R. J. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco: W. H. Freeman, 1972. 594 p.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 499-507, Dec. 2006.

YANG, Z. et al. Fermentative hydrogen production from lipid extracted microalgal biomass residues. **Applied Energy**, London, v. 88, n. 10, p. 3468-3472, Oct. 2011.

ZAMALLOA, C. et al. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 2, p. 1149-1158, Jan. 2011.

ANEXO

Fontes de variação		Quadrados médios						
<i>Extrato Aquoso</i>	GL	IVG	G. final	G. 3º dia	Rad.	Hip.	MS	MS/pl.
Microalgas	2	766,4100	1151,0556	1662,0000	0,9654	3,1939	124,5685	0,1107
St	1	391,1605	1691,6806	1615,0139	0,7606	1,1001	226,1356	0,1120
Conc.	2	0,8310	434,1806	145,5417	0,3629	1,4393	36,2406	0,0787
Microalgas x St	2	4,3416	1452,7222	427,3889	0,8151	2,6406	203,5510	0,1070
Microalgas x Conc.	4	129,1920	1693,9514	948,3542	0,1827	1,7539	195,7847	0,0989
St x Conc.	2	210,1178	1471,1806	2514,4306	0,7976	1,7110	169,1489	0,0961
Microalgas x St x Conc.	4	145,6230 *	1621,4097*	1862,2430*	0,3928*	2,1863*	153,9355*	0,0801*
Resíduo	54	3,1933	37,7000	44,3472	0,0306	0,0502	4,5531	0,0004
Cv (%)		9,22	8,70	11,17	11,94	8,10	9,36	3,43
<i>Extrato Metanólico</i>								
Microalgas	2	152,5689	338,0000	722,8889	0,4679	1,1029	21,3343	0,0082
St	1	143,7643	186,8889	833,6806	0,5689	2,1356	12,1689	0,0002
Conc.	2	128,4169	442,7916*	569,3889	0,2804	0,3454	84,1676	0,0094
Microalgas x St	2	105,3190	624,2222*	504,3888*	0,5685	1,8935	149,2635	0,0201
Microalgas x Conc.	4	18,4186	62,5417	170,8055*	0,9733	0,4296	10,7443	0,0020
St x Conc.	2	9,9353	49,7639	37,7222	0,1476	0,1143	3,5526	0,0098
Microalgas x St x Conc.	4	8,7267*	66,0972	56,8056	0,2847*	1,0334*	21,9897*	0,004952*
Resíduo	54	2,9213	30,6852	42,2917	0,0216	0,0322	5,1661	0,0013
Cv (%)		8,54	7,99	10,83	9,13	6,53	10,12	5,56