



UNIFACS
UNIVERSIDADE SALVADOR
LAUREATE INTERNATIONAL UNIVERSITIES

v. 6, n. 1, p. 38-47, jan./dez. 2016

revista
eletrônica de
Energia

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DE MEIO DE CULTURA PARA A MICROALGA *SPIROGYRA* SP. E DE POSSÍVEIS CRIOPROTETORES PARA SUA CONSERVAÇÃO

Rodolfo dos Santos Carrijo

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
rodolfo_carrijo@hotmail.com

Dallecyo Cerqueira Lopes

Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil
dallecyo.lopes@gmail.com

Taciano Peres Ferreira

Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil
rodolfo_carrijo@hotmail.com

Luiz Carlos Bertucci Barbosa

Universidade Federal de Itajubá, Brasil
luizcbb@mail.uft.edu.br

Gustavo Carvalho do Nascimento

Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil
rodolfo_carrijo@hotmail.com

Djales dos Santos Barros

Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil
rodolfo_carrijo@hotmail.com

Rodrigo Garcia Pinheiro

Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil
rodolfo_carrijo@hotmail.com

RESUMO

Os estudos relacionados ao emprego de microalgas para a síntese de biocombustíveis vêm ganhando espaço nos últimos anos, sendo estes motivados especialmente pelas várias problemáticas encontradas na utilização de culturas agrícolas convencionais para o mesmo fim. Nesse sentido, em função da grande capacidade de armazenar açúcares, a microalga *Spirogyra* sp. tem se destacado como possível matéria-prima para a produção de bioetanol. Com o intuito de otimizar o seu cultivo, o presente trabalho teve como objetivos a determinação da concentração de meio de cultura ideal para o seu desenvolvimento e de possíveis crioprotetores para a sua conservação por congelamento. Dentre as três concentrações analisadas do meio *Bold's Basal Medium* (20, 60 e 100%), o meio a 60% foi o que possibilitou o maior crescimento microalgal. Com relação aos criopreservantes testados, o glicerol se mostrou ineficiente como crioprotetor. Já para o dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol, os meios com 5%, 10% e 15% dos reagentes possibilitaram a reativação do metabolismo celular da microalga após um período de 21 dias de congelamento a -20° C. Pesquisas que busquem a potencialização do desenvolvimento da microalga *Spirogyra* sp. são essenciais para viabilizar o processo de produção de bioetanol em larga escala utilizando-a como matéria-prima. Contudo, apesar do enorme potencial e benefícios que ela apresenta quando empregada com esse propósito, estudos com esse objetivo ainda são limitados.

Palavras-chave: Biocombustíveis; Cultivo; Crioprotetor.

ABSTRACT

Studies related to microalgae use for the synthesis of biofuels have been gaining ground in recent years, which are especially motivated by the various problems encountered in the use of conventional crops for the same

purpose. In this sense, due to the large capacity to store sugars, the microalgae *Spirogyra* sp. It has been highlighted as a possible raw material for the production of bioethanol. In order to optimize your cultivation, this study aimed to determine the concentration of means of ideal culture for its development and possible cryoprotectants for their preservation by freezing. Of the three concentrations examined Bold's Basal middle Medium (20, 60 and 100%), the medium was 60% which enabled the highest microalgal growth. Regarding tested criopreservantes, glycerol was inefficient as cryoprotectants. As for the dimethyl sulfoxide (DMSO) and methanol, the media with 5%, 10% and 15% of the reagents allowed to reactivate the cellular metabolism of microalgae after a period of 21 days in a freezer at -20° C. searches to seek enhancement of the development of microalgae *Spirogyra* sp. They are essential to enable the bioethanol production process on a large scale using it as raw material. However, despite the huge potential and benefits it presents when used for this purpose, studies for this purpose are limited.

Key words: Biofuels; Cultivation; Cryoprotectant.

1 INTRODUÇÃO

Presentes nos mais diversos locais do planeta, as microalgas são organismos aquáticos fotossintetizantes com exigências simples de crescimento. Abrangendo organismos procarióticos e eucarióticos com clorofila e outros pigmentos acessórios, as microalgas são comumente identificadas e divididas com relação a morfologia celular e propriedades dos seus pigmentos (FAGERSTONE et al., 2011; HOMIAK, 2014; SCOTT et al., 2010).

Pertencente à divisão Chlorophyta, família Zygnemaceae, a microalga *Spirogyra* sp. é encontrada naturalmente em água doce, apresentando longas células filamentosas cilíndricas sem ramificações e, no seu interior, cloroplastos enrolados em espiral. Ela contém clorofilas a e b nas quais são as responsáveis pela sua cor verde, porém, em algumas condições de cultivo, pode apresentar coloração amarela ou laranja devido à presença de carotenoides (pigmentos secundários) (PACHECO et al., 2015).

Nos últimos anos, as pesquisas relacionadas ao uso de microalgas para a produção de biocombustíveis vêm ganhando destaque. Nesse sentido, as microalgas se sobressaem, especialmente, devido à grande produtividade de biomassa e necessidade de menor volume de água e espaço quando comparadas às culturas agrícolas convencionalmente empregadas com o mesmo objetivo (AMARO et al., 2011; CARRIJO et al., 2015; CHISTI, 2007).

A *Spirogyra* sp. apresenta cerca de 11-21% de lipídeos e um elevado teor de açúcar, cerca de 33-64%. Devido a sua elevada capacidade de acumular carboidratos, ela tem se destacado como possível matéria-prima para a produção de bioetanol. Todavia, estudos utilizando-a com esse intuito e que otimizem o seu cultivo ainda são bastante escassos (PACHECO et al., 2015).

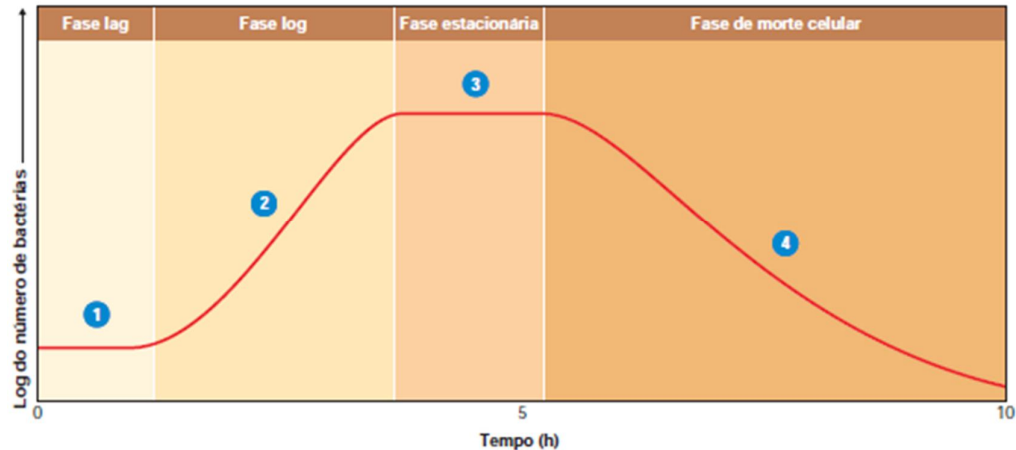
Durante o cultivo artificial de microalgas, para o melhor desenvolvimento destas, as condições de cultura devem assemelhar-se as encontradas nos seus habitats naturais. Por exemplo, a utilização de luz solar como fonte de energia tem como vantagem a redução dos custos de produção. Não obstante, isto pode não ser possível devido às variações diárias e sazonais de luz, que poderão influenciar o rendimento final de biomassa (NOBRE et al., 2013).

Outro ponto importante envolve as características do material nutriente preparado para o desenvolvimento do organismo requerido. Basicamente o meio de cultivo deve conter uma quantidade de

água suficiente e, pH, nível de oxigênio e nutrientes apropriados para que haja o crescimento da estirpe desejada (TORTORA et al., 2010).

Ao inocular, por exemplo, uma população microbiana viável em um meio adequado o crescimento celular exibe fases características quando representado graficamente em função do log do número de células em relação ao tempo (Figura 1) (MADIGAN et al., 2010; TORTORA et al., 2010).

Figura 1 - Curva típica do crescimento microbiano



Fonte: Tortora *et al.* (2010, p. 173).

A fase lag é caracterizada por exibir uma intensa atividade metabólica, porém sem aumento celular considerável. Na fase log, diferentemente, há um aumento logarítmico da população. Já no estágio denominado estacionário, há um equilíbrio entre a morte e produção de novas células. Por fim, na fase de morte celular, a população se reduz em uma taxa exponencial (GUIMARÃES & RÖRIG, 2004; TORTORA et al., 2010).

No que abrange a conservação de microalgas em bancos de cepas, normalmente as amostras celulares são congeladas lentamente, sendo mantidas em temperaturas muito baixas, preservando assim as suas características morfológicas e genéticas (por as cepas permanecerem em um estado metabolicamente inativo), além de evitar contaminações (ABREU et al., 2012; GWO et al., 2005).

Durante o congelamento lento, à água que circunda as células congela-se lentamente enquanto que o conteúdo intracelular permanece descongelado, acarretando assim o aumento da concentração de soluto no líquido extracelular. O aumento da pressão osmótica do meio extracelular força então a saída de água da célula por osmose e como consequência as células murcham, impedindo, dessa maneira, a formação de cristais de gelo no citoplasma e consequentemente o rompimento da membrana plasmática (ABREU et al., 2012; DAY, 2004; SANTOS, 2000).

No entanto, mesmo controlando rigidamente a velocidade em que ocorre o congelamento, a célula sofre ainda muitos danos durante o resfriamento vagaroso. Assim, para aumentar a viabilidade celular, antes do congelamento, faz-se necessário o acréscimo de crioprotetores às amostras, que consistem em substâncias

que, sob diferentes mecanismos moleculares, tornam as células protegidas do resfriamento e descongelamento (ABREU et al., 2012; DAY, 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

Tendo em vista o enorme potencial e benefícios que a *Spirogyra* sp. apresenta como matéria-prima para a produção de bioetanol, o presente trabalho teve como objetivos a determinação da concentração ótima de meio de cultura para o seu crescimento e de possíveis crioprotetores para a sua conservação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação

A *Spirogyra* sp. foi coletada em lagoas localizadas em torno do município de Formoso do Araguaia, Tocantins. Após a coleta, as amostras recolhidas foram encaminhadas para o Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, câmpus de Gurupi - UFT, onde a microalga foi identificada a partir de suas características morfológicas e isolada com o auxílio de um microscópio óptico.

2.2 Meio de cultura e condições de cultivo

O meio de cultura escolhido para o cultivo da microalga foi o BBM (*Bold's Basal Medium*) (NICHOLS & BOLD, 1965). Os cultivos foram realizados em sistema aberto, temperatura ambiente em torno de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes T8 de 18W, 14 horas luz: 10 horas escuro, e agitação por injeção contínua de ar pela ação de compressores (potência de 2,5 W e pressão de 0,012 MPa com saída de 3,2 L/min).

Após a coleta, para a adaptação da microalga ao novo ambiente, a mesma foi segregada em pequenas frações em tubos de ensaio de 50 mL (contendo volume útil de 25 mL de meio de cultura não diluído). Transcorridos 7 dias, as frações foram transferidas dos tubos para frascos de vidro de 250 mL (contendo volume útil de 100 mL de meio de cultura não diluído) e, passados mais 7 dias, dos frascos de 250 mL para outros de 500 mL (contendo volume útil de 300 mL de meio de cultura não diluído).

2.3 Determinação da biomassa úmida

A biomassa úmida foi determinada pesando-a logo após ao processo de filtração simples. Para a filtração, utilizou-se peneiras com telas de nylon com o objetivo de retirar o excesso de água presente nas amostras. Para a padronização da filtragem, todas as amostras permaneceram na peneira por um tempo de 5 minutos antes da pesagem.

2.4 Avaliação do desenvolvimento da *Spirogyra* sp. em diferentes concentrações do meio *Bold's Basal Medium*

Com o intuito de avaliar a resposta do crescimento microalgal sob diferentes concentrações do meio BBM, três concentrações foram utilizadas. Inicialmente, 1,65g (peso úmido) da microalga foram transferidos para frascos de vidro de 500 mL contendo 400 mL de meio nas concentrações de 20%, 60% e 100%, respectivamente (Figura 2). As análises foram realizadas semanalmente, por 59 dias.

Figura 2 - Cultivo da microalga em frascos de vidro de 500 mL em diferentes concentrações do meio BBM



2.5 Conservação da *Spirogyra* sp. por congelamento

Para a conservação da microalga por congelamento, utilizou-se o método de resfriamento lento. Foram testados 3 crioprotetores intracelulares (dimetilsulfóxido [DMSO], metanol e glicerol) em diferentes concentrações (5%, 10%, 15% e 20%). As amostras constituídas pelo meio de cultura a 60%, crioprotetor e *Spirogyra* sp. foram armazenadas em um freezer a -20°C por um período de 21 dias.

Após as três semanas de armazenamento, com o objetivo de remover o excesso dos crioprotetores, as amostras foram descongeladas e, com o auxílio de uma pinça, emergidas rapidamente por três vezes em béqueres contendo o meio BBM a 60%. Após a lavagem, as amostras foram ressuspensas em tubos de ensaio de 50 mL preenchidos com 25 mL de meio a 60%.

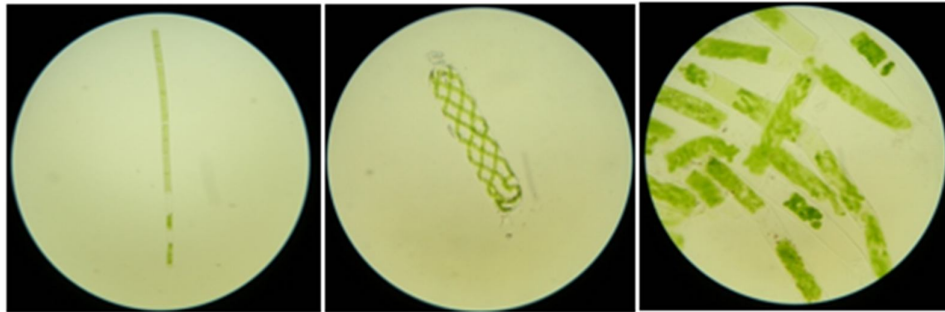
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação e caracterização

As microalgas coletadas nas lagoas localizadas em torno do município de Formoso do Araguaia - TO foram identificadas e caracterizadas a partir de suas características morfológicas, com o auxílio de um microscópio.

A partir da análise microscópica (Figura 3), ficou evidente que parte das amostras possuíam as mesmas características, como longas células filamentosas em formato cilíndrico, sem ramificações. No interior celular foi possível notar ainda algumas singularidades como estruturas, possivelmente cloroplastos, enroladas na forma de espirais, característica única vinculada ao gênero *Spirogyra* sp. (HAINZ et al., 2009).

Figura 3 - Identificação da microalga *Spirogyra* sp. por microscopia

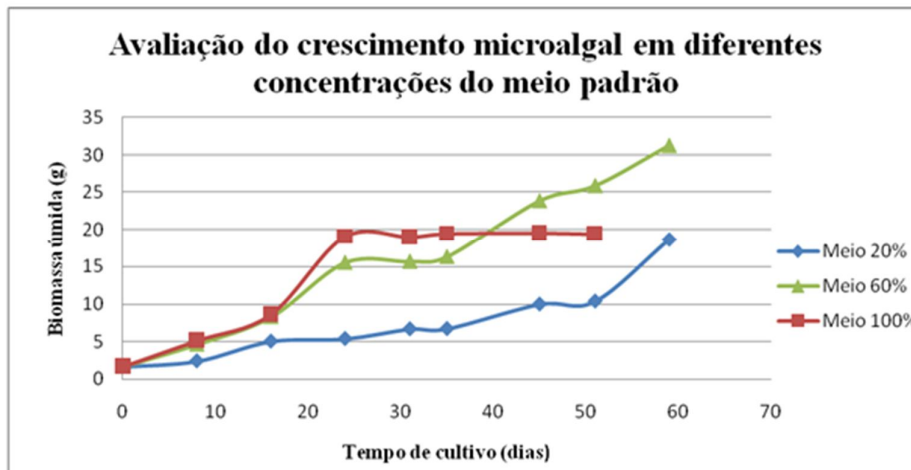


3. 2 Avaliação do desenvolvimento da *Spirogyra* sp. em diferentes concentrações do meio *Bold's Basal Medium*

Para a avaliação da resposta do crescimento da *Spirogyra* sp. sob diferentes concentrações do meio BBM, três concentrações distintas de meio (20%, 60% e 100%) foram testadas e comparadas.

Dentre os três ensaios, observou-se que a cultura contendo 20% de meio foi a que exibiu o menor crescimento em função da sua maior permanência na fase lag, provavelmente estimulada pela disponibilidade reduzida de nutrientes (Figura 4).

Figura 4 - Avaliação do crescimento microalgal em diferentes concentrações do meio BBM



Para se desenvolverem em qualquer meio de cultivo, os organismos devem possuir um aparato enzimático completo que possibilite a síntese dos metabólitos essenciais ao crescimento. Logo, quando

transferidos para sistemas onde os metabólitos essenciais não estão presentes ou em quantidades insuficientes, um intervalo de tempo maior é requerido para a biossíntese das novas enzimas, o que explica o prolongamento da fase lag (GUIMARÃES & RÖRIG, 2004; MADIGAN et al., 2010; TORTORA et al., 2010).

Com relação ao cultivo contendo o meio a 100%, apesar de o mesmo ter apresentado um desenvolvimento na fase logarítmica mais acentuado quando comparado as outras duas culturas, ele foi o primeiro a entrar nas fases estacionária e de morte celular, respectivamente. A princípio, por a *Spirogyra* sp. ser uma microalga de água doce e o cultivo não diluído conter maiores quantidades de sais, esta condição pode ter gerado um maior estresse na estirpe, especialmente com relação ao equilíbrio osmótico, na qual abreviou o seu tempo de vida.

Quando o conteúdo citoplasmático de uma célula exibe concentrações de soluto maiores que o meio extracelular, solventes, como a água, tendem a difundir-se para dentro da célula. Contudo, em situações que ocorre o inverso, ou seja, a célula apresenta concentrações de soluto menores que o meio circundante, a água tende a fluir para fora (GUIMARÃES & RÖRIG, 2004; NELSON & COX, 2011). Nesse sentido, caso a célula não possua dispositivos para contrabalancear o processo de saída da água, este fenômeno poderá ocasionar sérios danos ao organismo, comprometendo o seu desenvolvimento.

Já a cultura com 60% de meio, foi a que permitiu o maior crescimento da *Spirogyra* sp., permanecendo na fase log ao final do experimento, certamente por resolver os fatores limitantes encontrados nos ensaios com 20 e 100% de meio de cultura. 7

3.3 Conservação da *Spirogyra* sp. por congelamento

Com o objetivo de reduzir os efeitos danosos que afetam as células durante os processos de congelamento e descongelamento, crioprotetores são normalmente adicionados às amostras celulares (OLIVEIRA et al., 2013). Para a conservação da *Spirogyra* sp., foram testados 3 crioprotetores intracelulares (DMSO, metanol e glicerol) em diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20%), empregando-se o método de resfriamento lento.

Os criopreservantes intracelulares são denominados dessa maneira por serem capazes de penetrar nas células. De forma geral, a atividade protetora destes compostos está associada com a tendência que possuem de formar ligações com a água (interferindo na formação dos cristais de gelo) e grupos fosfato dos fosfolípidos de membrana (estabilizando as membranas celulares). Além disso, protegem as amostras das injúrias causadas pela alta concentração de eletrólitos por serem ligarem aos próprios eletrólitos (CASTRO et al., 2011; FAUSTINO et al., 2010).

Após os 21 dias de armazenamento no freezer a -20° C, as amostras foram ressuspensas em tubos de ensaio de 50 mL contendo 25 mL de meio de cultura a 60%. Após o descongelamento, o excesso dos crioprotetores foi removido das amostras, em virtude do DMSO, metanol e glicerol serem tóxicos às células, devendo por isso ser adicionados à amostra apenas no momento do resfriamento.

Para o glicerol, nenhuma das quatro concentrações testadas (5%, 10%, 15% e 20%) possibilitaram a reativação do metabolismo da *Spirogyra* sp. após a ressuspensão. Apesar do extenso uso do glicerol como crioprotetor e dos resultados positivos já demonstrados quando utilizado com este fim, a sua eficácia pode

variar, por exemplo, em função da sua concentração, tempo de exposição e tipo celular a ser criopreservado (FULLER & PAYNTER, 2004).

Sua ineficiência neste caso provavelmente está relacionada a sua toxicidade. Quando no interior celular, o glicerol pode comprometer seriamente a sobrevivência das células após o descongelamento por alterar características celulares importantes como a viscosidade do citoplasma, estrutura das proteínas de membrana e, permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica (CASTRO et al., 2011; SILVA & GUERRA, 2011).

Nesse sentido, outras metodologias para o glicerol podem ser testadas como forma de aumentar a viabilidade celular após o descongelamento. Por exemplo, em substituição ao método de resfriamento lento, pode-se utilizar a técnica de resfriamento rápido utilizando nitrogênio líquido, mantendo as amostras congeladas a -20°C .

Já para o DMSO e metanol, as concentrações de 5%, 10% e 15% facultaram a retomada do crescimento celular, ou seja, apenas as amostras contendo 20% dos reagentes não sobreviveram, possivelmente devido a maior toxicidade dos mesmos nestas concentrações. Em trabalho similar, Gwo e outros (2005), ao trabalharem com a microalga *Nannocloropsis oculata*, verificaram toxicidade para o DMSO e metanol apenas em concentrações maiores que 30%.

Em estudos com a espécie *Thalassiosira weissflogii*, Abreu e outros (2012) observaram resultados positivos com DMSO 10% e Metanol 5% quando aplicada a técnica de resfriamento lento (as amostras foram resfriadas até -80°C antes de serem submetidas ao nitrogênio líquido). Já a microalga *Skeletonema* sp. não resistiu a criopreservação em nenhuma das condições analisadas (ABREU et al., 2012).

Segundo Day (2004), o principal entrave na criopreservação de microalgas consiste no fato de que um protocolo eficiente para determinada espécie pode exibir bons resultados para estirpes próximas, mas não com espécies distantes. Assim, devido as diferenças existentes entre as espécies microalgais, a adequação ou elaboração de protocolos específicos para algumas cepas são necessárias.

4 CONCLUSÃO

Com relação ao desenvolvimento da microalga em diferentes concentrações do meio BBM, o meio a 60% foi o que lhe permitiu o maior crescimento.

No que abrange os ensaios de conservação por congelamento, em todas as concentrações testadas, quando utilizado o método de resfriamento lento o glicerol se mostrou ineficiente como crioprotetor.

Outras metodologias empregando o glicerol podem ser exploradas para verificar realmente a sua eficácia como criopreservante para a microalga *Spirogyra* sp.

Para o DMSO e metanol, os meios com 5%, 10% e 15% dos reagentes possibilitaram a reativação do metabolismo celular após os 21 dias de congelamento.

Apesar dos ótimos resultados observados para o DMSO e metanol, mais ensaios devem ser realizados para a criação de um protocolo de preservação da microalga *Spirogyra* sp.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L.; BORGES, L.; MARANGONI, J.; ABREU, P. C. Cryopreservation of some useful microalgae species for biotechnological exploitation. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 6, p. 1579-1588, 2012.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.
- CARRIJO, R. S.; SILVA, V. C. F.; DOS SANTOS, A. C. M.; COSTA, M. F.; FERREIRA, T. P. Uso de microalgas para a produção de biodiesel: vantagens e limitações. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, 2015.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; DA SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; DE FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- DAY, J. G. Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. **Nova Hedwigia**, v. 79, n. 1-2, p. 191-205, 2004.
- FAGERSTONE, K. D.; QUINN, J. C.; BRADLEY, T. H.; DE LONG, S. K.; MARCHESE, A. J. Quantitative measurement of direct nitrous oxide emissions from microalgae cultivation. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 21, p. 9449-9456, 2011.
- FAUSTINO, L. R.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M. G.; PINTO, L. C.; CELESTINO, J. J. H.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal reproduction science**, v. 122, n. 1, p. 90-97, 2010.
- FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive biomedicine online**, v. 9, n. 6, p. 680-691, 2004.
- GUIMARÃES, S. C. P.; RÖRIG, L. R. Efeito da salinidade no crescimento dos dinoflagelados *Prorocentrum micans* Ehrenberg e *Prorocentrum cf. obtusum* Ostenfeld isolados da costa catarinense-Brasil. **Revista Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 26, n. 54, p. 29-36, 2004.
- GWO, J. C.; CHIU, J. Y.; CHOU, C. C.; CHENG, H. Y. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 338-343, 2005.
- HAINZ, R.; WÖBER, C.; SCHAGERL, M. The relationship between *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta) filament type groups and environmental conditions in Central Europe. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 3, p. 173-180, 2009.
- HOMIAK, J. A. Produção de biodiesel utilizando microalgas. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 2, p. 65-74, 2014.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. 2011. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1328p.
- NICHOLS, H. W.; BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, n. 1, p. 34-38, 1965.
- NOBRE, B. P.; VILLALOBOS, F.; BARRAGAN, B. E.; OLIVEIRA, A. C.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; GOUVEIA, L. Biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga—Extraction of microalgal oils and pigments and biohydrogen production from biomass leftover. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 128-36, 2013.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B. M. M.; CELEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 37, n. 1, p. 23-28, 2013.

PACHECO, R.; FERREIRA, A. F.; PINTO, T.; NOBRE, B. P.; LOUREIRO, D.; MOURA, P.; SILVA, C. M. The production of pigments & hydrogen through a Spirogyra sp. biorefinery. **Energy Conversion and Management**, v. 89, p. 789-797, 2015.

SANTOS, I. R. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277-286, 2010.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 934p.