

**Carolina Tolomini Miranda**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INTENSIDADE  
LUMINOSA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE  
LIPÍDEOS POR *ANKISTRODESMUS* SP.  
(CHLOROPHYCEAE) VISANDO A PRODUÇÃO DE  
BIODIESEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOTECNOLOGIA VEGETAL)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Pós graduação em Biotecnologia Vegetal**

**2011**

**Carolina Tolomini Miranda**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INTENSIDADE  
LUMINOSA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE  
LIPÍDEOS POR *ANKISTRODESMUS* SP.  
(CHLOROPHYCEAE) VISANDO À PRODUÇÃO DE  
BIODIESEL**

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção  
do grau de mestre em Ciências Biológicas (Biotecnologia Vegetal).

**Orientadora: Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo**

**Co- orientador: Dr. Ricardo Machado Kuster**

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Pós graduação em Biotecnologia Vegetal**

**2011**

Miranda, Carolina Tolomini

Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de lipídeos por *Ankistrodesmus* sp. (Chlorophyceae) visando à produção de biodiesel. Rio de Janeiro, 2011.

xvi, 73f.:il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós graduação em Biotecnologia Vegetal, 2011

Orientador: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Co-orientador: Ricardo Machado Kuster

1. Biodiesel. 2. Intensidades luminosas. 3. Auto-sombreamento. 4. Microalgas. 5. Cultivo. 6. Lipídeos. I. Azevedo, Sandra Maria Feliciano de Oliveira e. II. Kuster, Ricardo Machado. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós graduação em Biotecnologia Vegetal. IV. Título.

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO  
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR *ANKISTRODESMUS* SP.  
(CHLOROPHYCEAE) VISANDO À PRODUÇÃO DE BIODIESEL”

## CAROLINA TOLOMINI MIRANDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, ..... DE ..... DE 2011.

---

PROF<sup>a</sup>. FERNANDA REINERT (DOUTOR-UFRJ)  
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOTECNOLOGIA VEGETAL)

---

PROF<sup>a</sup>. SANDRA MARIA FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO (DOUTOR-UFRJ)  
ORIENTADOR

---

PROF. RICARDO MACHADO KUSTER (DOUTOR –UFRJ) CO-ORIENTADOR

---

PROF<sup>a</sup>. FERNANDA REINERT (DOUTOR-UFRJ)

---

PROF. MARCELO MANZI MARINHO (DOUTOR –UERJ)

*À minha orientadora*

*Por ensinar uma ciência profundamente humana para muito além da coleta de dados, da resolução de equações e das questões ainda sem respostas.*

“O primeiro passo é o aprendizado”

Dalai Lama

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à coordenação da pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio na divulgação deste trabalho no XIII Congresso Brasileiro de Ficologia.

Agradeço a contribuição dos coordenadores do projeto no qual a minha dissertação está inserida, Leonardo Bacellar e Rafael Richard.

Agradeço também aos professores Marcelo Manzi Marinho, Fernanda Reinert e Ricardo M. Kuster que participaram da banca examinadora na defesa do projeto dessa dissertação e contribuíram com o planejamento deste trabalho.

Agradeço muito à minha orientadora Sandra Azevedo, minha grande incentivadora, que sempre forneceu todas as condições para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço ao meu co-orientador Professor Ricardo M. Kuster pela disponibilidade e por toda contribuição feita a este estudo e ao nosso grupo.

Agradeço às professoras Valéria e Raquel pela amizade e pela boa vontade em fazer a primeira revisão de alguns textos inicialmente tortuosos.

Agradeço aos meus colegas de time, Simone, Priscila, Bárbara, Rosane, Roberta Fernandes, Lais e Daniel Vinícius.

Tenho muito a agradecer ao Daniel Vinícius por toda dedicação e entusiasmo durante o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço à Lais, tenho certeza que aprendemos muito trabalhando juntas.

Agradeço ao Ari Miranda e à Bárbara Castro que generosamente contribuíram para a realização de importantes análises.

Agradeço muitíssimo a todos do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias: Andréia, Ana Cláudia, Ana Lucia, Ana Svoboda, Simone, Beta, Bel, Roberta, Ricardo, Roberta F., Rodrigo, Bárbara, Elis, Priscila, Iamê, Lais, Luana, Pedro, Ramon, Rosane, Adriana, César, Daniel, Fernanda, Gustavo e Thais. Obrigada D. Miriam.

Eu li outro dia que, além de todos aqueles valores intrínsecos ao indivíduo, o “fator sorte” é decisivo para que alguma coisa dê realmente certo na vida de uma pessoa. Eu também quero agradecer à minha sorte.

A sorte de ter a Simone por perto que, com a paciência que a experiência lhe permite, me ajudou a buscar tranquilidade durante a redação da dissertação.

Agradeço à sorte de ter a Dedéia como vizinha, amiga querida de todas as horas.

A sorte de ter um amigo criativo como o Pedro.

Agradeço à sorte de chegar bem cedinho e dividir um café com a Val e a Bel, é fácil começar o dia de bom humor.

A sorte de receber os mimos da lamê, da Beta e o abraço esmagador da Elis.

Agradeço a sorte de ter amigos.

De ter uma família.

De começar a semana com as ótimas sacadas do Rodrigo Godoy.

Agradeço muitíssimo a sorte de ver meu namorado, tão querido, ganhando novas responsabilidades e com muita simplicidade passando por elas como se não houvesse desafio ali. Juntos, temos a sorte de ter um ao outro.

Não sei se acredito em destino. Também não acredito que tenho controle absoluto sobre minha vida. Prefiro o meio do caminho e acreditar que a sorte também decide a vida.

Tomara que eu continue tendo sorte no futuro.

Muito obrigada a todos vocês.

## RESUMO

MIRANDA, Carolina Tolomini. Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de lipídeos por *Akistrodesmus* sp. (Chlorophyceae) visando à produção de biodiesel. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Biotecnologia Vegetal) – Pós graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A variação da intensidade luminosa pode promover alterações na morfologia e nas características fotossintéticas das microalgas. No entanto, ainda não está claro o efeito de altas intensidades luminosas no aumento da produção de lipídeos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a variação do acúmulo de lipídeos durante o crescimento de uma linhagem de *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01) submetidas as intensidades luminosas semelhantes as encontradas em ambientes naturais. Foram escolhidas as intensidades luminosas de 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . As células foram cultivadas durante 20 dias em meio ASM-1 a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , pH inicial de 8 e fotoperíodo de 12 horas. As amostragens para a contagem do número de células, concentração de clorofila-a e carboidratos foram realizadas em dias alternados e a produção de lipídeos foi acompanhada em quatro diferentes fases do cultivo: 4º dia (fase exponencial do crescimento), 8º dia (desaceleração do crescimento), 12º e 19º dias (fase estacionária do crescimento). A maior taxa de crescimento celular (0,62) foi verificada nos cultivos iniciados em 900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . Em 1400 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  essas taxas foram de 0,59 e 0,58, respectivamente. A produção de biomassa também foi maior nos cultivos iniciados em 900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  ( $894\pm 53 \text{ mg.L}^{-1}$ ) seguidos de  $841\pm 40,3 \text{ mg.L}^{-1}$  para 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  e  $771\pm 3,2 \text{ mg.L}^{-1}$  para os cultivos iniciados em 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . Em contraste os maiores percentuais de extrato bruto lipídico foram obtidos em 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ , chegando a  $46\pm 7,3\%$  da biomassa, enquanto que em 900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  foram alcançados  $40\pm 4\%$  e  $33\pm 7,8\%$  em 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . Os maiores rendimentos de metil ésteres de ácido graxo ( $68\pm 20,5\%$ ) foram obtidos em 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  enquanto em 900 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  foram obtidos  $37\pm 4,4$  e  $33\pm 5,7\%$ , respectivamente. A análise por cromatografia gasosa mostrou que o perfil dos metil ésteres encontrado é adequado para a produção de biodiesel. Os resultados mostraram que a intensidade luminosa normalmente encontrada nos primeiros centímetros da coluna d'água são elevados o suficiente para permitir uma boa produção de biomassa e síntese dos ésteres de ácido graxo interessantes para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Biodiesel, intensidades luminosas, auto-sombreamento, microalgas, cultivo e lipídeos.

## ABSTRACT

MIRANDA, Carolina Tolomini. Effects of light intensity in Growth and lipid production by *Akistrodesmus* sp. (Chlorophyceae) for biodiesel production. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Biotecnologia Vegetal) – Pós graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The variation in light intensity can promote changes in morphology and photosynthetic characteristics of microalgae. However, is still unclear if high light intensities could have a role in lipids production. The aim of this study was to investigate the variation of lipids accumulation during growth of a strain of *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01) under different light intensities: 900, 1400 and 2000  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Cultures were grown during 20 days in bath culture conditions, ASM-1 medium, at  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , pH 8 and light\dark cycles of 12 hours. Sampling was done every two days for analysis of cell number, chlorophyll-*a* and carbohydrates concentration. Lipid production was determined at: 4<sup>th</sup> (exponential phase), 8<sup>th</sup> (early stationary phase), 12<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> (stationary phase) days. The maximum yield of increase (defined as maximum cells number divided of the inoculum cells) was 0,62 in 900  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . In 1400 and 2000  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  these rates were 0,59 and 0,58 respectively. Biomass production was highest at the lowest light intensity ( $894 \pm 53\text{mg.L}^{-1}$ ). These values were  $841 \pm 40.3\text{mg.L}^{-1}$  for 1400  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and  $771 \pm 3.2\text{mg.L}^{-1}$  for 2000  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . In contrast the highest percentages of lipid extracts were obtained in 2000  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , reaching  $46 \pm 7.3\%$  of biomass, while in 900  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  it reached  $40 \pm 4\%$  and  $33 \pm 7,8\%$  in 1400  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . The highest yield of fatty acid esters ( $68 \pm 20.5\%$ ) were obtained in 1400  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  while in 900 and 2000  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  were  $37\pm 4.4$  and  $33\pm 5.7\%$  respectively. Gas chromatography analysis showed that ester profile is adequate to biodiesel production. Data showed that light intensities usually found in surface water column are high enough to allow a good biomass and synthesis of fatty acid esters adequate to biodiesel production.

Key words: Biodiesel, light intensity, mutual shading, microalgae, cultivation and lipids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1: Sistema de cultivo aberto tipo pista de corrida..... 2

Figura 2: Sistema de cultivo fechado externo (fotobiorreator)..... 3

### MATERIAL E MÉTODOS

Figura 3: Etapas da extração dos lipídeos: (A) maceração da biomassa , (B) extração com solvente em mesa agitadora, (C) separação da biomassa celular após a extração dos lipídeos, (D) éster bruto lipídico resultante da derivatização do extrato bruto lipídico..... 18

Figura 4: Esquema do experimento “Efeitos da intensidade luminosa sobre o crescimento e a síntese de lipídeos”..... 19

Figura 5: Arranjo do conjunto de lâmpadas fluorescentes usadas nos experimentos com intensidades luminosas iniciais de 900, 1300 e 2000  $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$  respectivamente..... 21

### RESULTADOS

Figura 6: Micrografia em microscopia óptica (campo claro) de *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01) após 12 dias de cultivo em 900 $\mu\text{moles fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ , aumento de 1000x..... 29

Figura 7: Curvas de crescimento de *Ankistrodesmus* sp. (ANFR-01) submetida a três intensidades luminosas: 900, 1400 e 2000 $\mu\text{moles fótons m}^2.\text{s}^{-1}$ ..... 32

Figura 8: Valores médios da biomassa seca produzida por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas de 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Diferenças significativas: \*( $p < 0,5$ ) e \*\*( $p < 0,01$ )..... 34

Figura 9: Variação da concentração de clorofila-a em  $\mu\text{g } 10^5.\text{cél}^{-1}$  nos cultivos de *Ankistrodesmus* sp. em 900, 1400 e 2000 $\mu\text{moles fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  , até o 12º dia de cultivo..... 35

Figura 10: Variação do acúmulo de carboidratos intracelulares por *Ankistrodesmus* sp em  $\text{mg}.10^5 \text{cél}^{-1}$  intensidades luminosas testadas..... 37

Figura 11: Variação dos carboidratos extracelulares em  $\text{mg}.10^5 \text{cél}^{-1}$  excretados por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas testadas..... 38

Figura 12: Variação do percentual de carboidratos excretados em relação ao conteúdo de carboidratos intracelulares por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas testadas..... 39

Figura 13: Variação da massa dos extratos brutos lipídicos em  $\text{mg.L}^{-1}$  (A) e  $\text{mg}.10^5 \text{cél}^{-1}$  (B) produzidos por *Ankistrodesmus* sp. nos cultivos em 900, 1400 e 2000 $\mu\text{moles fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ..... 41

Figura 14: Variação da massa bruta total de éteres metílicos de ácidos graxos (FAME), resultantes da derivatização dos extrato brutos lipídicos em  $\text{mg.L}^{-1}$  (**A**) e  $\text{mg.10}^5 \text{ céls}^{-1}$  (**B**) produzidos por *Ankistrodesmus* sp. nos cultivos em 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Diferença significativa:  $*(p<0,05)$ ..... 43

Figura 15: Relação percentual do total de ésteres de ácidos graxos no extrato bruto lipídico produzido por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas testadas..... 44

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela I: Compostos bioativos encontrados em diferentes microalgas. Adaptado de Plaza *et al.* 2009..... 4

Tabela II: Espécies de microalgas e suas respectivas concentrações lipídicas. Adaptado de: Myiamoto (1997); Sánchez-Saavedra e Voltolina (2005) e Schenk *et al.*(2008)..... 5

### RESULTADOS

Tabela III: Variações da temperatura nos cultivos sob diferentes intensidades luminosas..... 29

Tabela IV: Valores de pH do meio ASM-1 e no 19º dia de cultivo, nas três intensidades luminosas testadas..... 30

Tabela V: Variações das intensidades luminosas, a partir do inóculo de *Ankistrodesmus* sp. até o 19º dia de cultivo..... 30

Tabela VI: Valores da curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp. Média entre as triplicatas seguidas do erro padrão.  $N_0$  e  $N_{máx}$ : densidade celular inicial e máxima,  $\mu$ : taxa de crescimento, R: razão máxima de crescimento; \* indica diferença significativa ( $P=0,028$ )..... 33

Tabela VII: Variação da produtividade da biomassa durante a fase exponencial de crescimento, produtividade lipídica (extrato bruto lipídico) e produtividade dos ésteres totais ao final de 19 dias de cultivo em função da intensidade luminosa testada..... 44

Tabela VIII: Massa dos ésteres de ácido graxo ( $ng.10^5cél.mL^{-1}$ ) resultantes da metilação do extrato bruto lipídico de cada réplica do cultivo iniciado na intensidade luminosa de  $900 \mu moles \text{ fótons } m^{-2}.s^{-1}$  ..... 47

Tabela IX: Massa dos ésteres de ácido graxo ( $ng.10^5cél.mL^{-1}$ ) resultantes da metilação do extrato bruto lipídico de cada réplica do cultivo iniciado na intensidade luminosa de  $1400 \mu moles \text{ fótons } m^{-2}.s^{-1}$  ..... 48

Tabela X: Concentração dos ésteres de ácidos graxos ( $ng.10^5cél.mL^{-1}$ ) resultantes da metilação do extrato bruto lipídico de cada réplica do cultivo iniciado na intensidade luminosa de  $2000 \mu moles \text{ fótons } m^{-2}.s^{-1}$  ..... 49

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS.....	1
1.2. BIODIESEL.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1. EXPERIMENTO PILOTO.....	16
3.1.1. CRESCIMENTO CELULAR.....	16
3.1.2. EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS.....	17
3.2. EXPERIMENTO “EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO E SÍNTESE DE LIPÍDEOS POR <i>ANKISTRODESMUS SP.</i> ”.....	19
3.2.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	22
3.3.1.1 VARIAÇÕES DA TEMPERATURA.....	22
3.3.1.2 DETERMINAÇÃO DO PH.....	22
3.3.1.3. ATENUAÇÃO DA INTENSIDADE LUMINOSA.....	22
3.3.2. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	23
3.3.2.1. CRESCIMENTO CELULAR.....	23
3.3.2.2. OBTENÇÃO DA BIOMASSA .....	23
3.3.2.3. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA- <i>a</i> .....	23
3.3.2.4. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CARBOIDRATOS.....	24
3.3.2.5. EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS .....	25
3.3.2.6. METILAÇÃO DOS ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	26
3.3.2.7. CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES POR CG.....	26
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
4.1. EXPERIMENTO PILOTO.....	28
4.1.1. CRESCIMENTO E PRODUÇÃO LIPÍDICA.....	28

4.2. EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO E SÍNTESE DE LIPÍDEOS POR <i>ANKISTRODESMUS</i> SP.....	29
4.2.1. VARIAÇÃO DA TEMPERATURA NO INTERIOR DOS CULTIVOS.....	29
4.2.2. VARIAÇÃO DO pH.....	29
4.2.3. ATENUAÇÃO DA INTENSIDADE LUMINOSA.....	30
4.2.4. CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>ANKISTRODESMUS</i> SP.....	32
4.2.5. PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	34
4.2.6. VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE CLOROFILA- <i>a</i> .....	35
4.2.7. PRODUÇÃO E EXCREÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	37
4.2.8. PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS.....	41
4.2.8.1. EXTRATO BRUTO LIPÍDICO.....	41
4.2.8.2. METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	42
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## 1 – Introdução

### 1.1- Potencial biotecnológico das microalgas

O cultivo de microalgas é uma importante ferramenta para o entendimento da fisiologia das diferentes espécies e ambientes controlados. As microalgas incluem um vasto grupo de organismos, distribuído desde as regiões polares até as regiões tropicais, são fundamentais para a sustentação de ecossistemas marinhos e de água através da produção primária ao mesmo tempo em que produz o oxigênio atmosférico (Falkowski & Raven, 2007 apud Finkel, *et al.* 2010). Estima-se que a contribuição das algas de forma geral no processo de produção deste oxigênio estaria em torno de 40 a 50% (Andersen, 2005). O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, mas a diversidade de formas e de ambientes onde são encontradas também se reflete na composição bioquímica destes organismos. O termo microalga não apresenta valor taxonômico e a distinção de diferentes *taxa* em que as microalgas estão inseridas levam em consideração aspectos bioquímicos e estruturais, dentre eles o tipo de pigmento, produtos de reserva, constituintes de parede celular, aspectos citológicos, aspectos morfológicos e parâmetros de biologia molecular (Derner *et al.*, 2006). Dois aspectos das microalgas são considerados importantes para a sociedade e devem ser destacados: (i) o potencial de algumas espécies para serem mantidas em cultivo (Borowitzka & Borowitzka, 1988) e (ii) sua capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos de alto valor agregado (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Richmond, 1988; Shimizu, 1996, Pulz & Gross, 2004).

Os sistemas de cultivo de microalgas foram desenvolvidos durante as primeiras décadas do século XX. Segundo Borowitzka (1999), estes organismos podem ser cultivados em diversos sistemas de produção. Os sistemas de cultivo em larga escala comumente empregados são do tipo “open ponds” ou pista aberta (Figura 1) onde tanques de tamanhos variados são mantidos a céu aberto, expostos a condições

naturais de iluminação e temperatura. Estes tanques geralmente são rasos, construídos em concreto, fibra de vidro ou policarbonato, com fundo de terra ou revestidos com material plástico, onde as culturas são mantidas em circulação constante.

Outro tipo mais sofisticado de cultivo vem sendo desenvolvido em fotobiorreatores (Figura 2). Estes equipamentos visam alcançar elevadas escalas de produtividade e os cultivos são realizados em sistema fechado construídos com tubos plásticos, vidro ou carbonato, distribuídos em painéis de forma achatada ou em serpentinas. Um aspecto muito interessante dos fotobiorreatores é a possibilidade de controlar as condições de cultivo. Dessa forma a quantidade de nutrientes, temperatura, luz e pH podem ser ajustados para a obtenção de maior biomassa em um espaço de tempo menor.



Figura 1: Sistema de cultivo aberto tipo pista de corrida. Fonte: <http://news.cnet.com/greentech>.



Figura 2: Sistema de cultivo fechado externo (fotobiorreator). Fonte: [wttp://energiasrenovaveis.wordpress.com](http://energiasrenovaveis.wordpress.com)

Dentre as microalgas inicialmente mantidas em cultivo podemos citar os gêneros: *Chlorella* (Chlorophyta), primeira a ser isolada e mantida em cultura pura para estudos sobre fotossíntese; *Dunaliella* (Chlorophyta), muito utilizada para a produção de alimento em aquicultura, produção de  $\beta$ -caroteno e glicerol; *Scenedesmus* (Chlorophyta) utilizada para estudos de fisiologia e produção de carotenóides secundários como astaxantina e cantaxantina; *Spirulina* (Cyanobacteria) para estudos de fisiologia, incluindo a produção de lipídeos e lipopolissacarídeos e *Porphyridium* (Rhodophyta) para estudos de fisiologia, sendo uma das primeiras a ter sua importância reconhecida pelas altas concentrações de polissacarídeos e ácidos graxos (Borowitzka & Borowitzka 1988; Chisti, 2007; Schenk *et al.*, 2008). Além da consolidada produção para a obtenção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados importantes para a dieta humana (Congming *et al.*, 2001; Mansour *et al.*, 2005; Chisti, 2007, Solovchenko & Golderg, 2008). Estes compostos apresentam propriedades terapêuticas e são interessantes também para o condicionamento de solo (biofertilizantes), tratamento de água (biorremediação) e alimentação de cultiváveis em aquicultura (Richmond, 1988; Chisti, 2007). As aplicações de alguns dos compostos

produzidos por microalgas com potenciais usos biotecnológicos seguem descritos na Tabela I.

Tabela I: Compostos bioativos encontrados em diferentes microalgas. Adaptado de Plaza *et al.* 2009.

Compostos bioativos	Potenciais efeitos na saúde	Método analítico	Microalga - espécie	Referências
<b>Carotenóides</b>				
B-caroteno	antioxidante	LC-UV	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i>	Mendes <i>et al.</i> 2003, Nobre <i>et al.</i> 2006
Astaxantina	antioxidante	LC-UV	<i>H.pluvialis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	Nobre <i>et al.</i> 2006, Mendes <i>et al.</i> 1995
Cantaxantina	antioxidante	HPLC	<i>C. vulgaris</i>	Mendes <i>et al.</i> 1995
Luteína	antioxidante	LC-DAD	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>H. pluvialis</i>	Wu <i>et al.</i> 2007, Nobre <i>et al.</i> 2006
Viclaxantina	antioxidante	LC-MS	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Cha <i>et al.</i> 2008
<b>Ácidos graxos</b>				
Ácido graxo eicosapentaenóico (EPA)	protetor cardiovascular	GC	<i>Porphyridium tricornutum</i>	Ramirez-Fajardo <i>et al.</i> 2007
Ácido oléico	síntese de hormônios	GC	<i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>D. salina</i> , <i>Spirulina platensis</i>	Céron, <i>et al.</i> 2007, Mendes <i>et al.</i> 1995, Herrero <i>et al.</i> 2006, Mendeola <i>et al.</i> 2007
Ácido linoléico	ação	GC-MS	<i>D. salina</i> , <i>S.</i>	Herrero <i>et al.</i>

	antimicrobiana		<i>platensis</i>	2006, Xu <i>et al.</i> 2002
Ácido Palmítico		GC-MS	<i>D. salina</i>	Herrero <i>et al.</i> 2006
Ácido palmitoleico	protetor cardiovascular	GC-FID	<i>S. platensis</i>	Mendeola <i>et al.</i> 2007
<b>Proteínas</b>				
Ficobiliproteínas	antioxidante	CE-TOF-MS	<i>S. platensis</i> , <i>Porphyridium spp.</i>	Herrero <i>et al.</i> 2005; Simó <i>et al.</i> , 2005, Stadnichuk <i>et al.</i> 1997
<b>Vitaminas</b>				
E	antioxidante	HPLC-FD	<i>Porphyridium sp.</i> , <i>S. platensis</i>	Durmaz <i>et al.</i> 2007, Mendeola <i>et al.</i> 2008
<b>Compostos fenólicos</b>				
Derivados do ácido benzóico	antioxidante	HPLC-MS	<i>S. platensis</i>	Klejdus <i>et al.</i> 2009

---

Atualmente, essas substâncias são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também incorporadas em massas, doces e bebidas, tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais (Becker, 2004; Pulz & Gross, 2004). Outro aspecto interessante da produção de metabólitos por microalgas está na produção de ácidos graxos, óleos e hidrocarbonetos. Em algumas condições, as microalgas podem produzir altas concentrações de lipídeos, em média de 20 a 40% de seu peso seco, podendo chegar a concentrações de até 85% (Richmond, 1988; Sánchez-Saavedra & Voltolina, 2005 e Schenk *et al.*, 2008).

Tabela II: Espécies de microalgas e suas respectivas concentrações lipídicas. Adaptado de: Myiamoto (1997); Sánchez-Saavedra & Voltolina (2005) e Schenk *et al.* (2008).

---

Divisão	Espécie	Concentração lipídica (% de lipídeos por peso seco)
---------	---------	-----------------------------------------------------

---

	<i>Botryococcus brawnii</i>	25-75
	<i>Chorella sp.</i>	28-32
	<i>Chlorella vulgaris</i>	14-22
	<i>Dunaliella primoteca</i>	23
	<i>Dunaliella bioculata</i>	8
	<i>Dunaliella salina</i>	6
	<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
Chlorophyta	<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
	<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23
	<i>Tetraselmis maculata</i>	3
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-14
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21
	<i>Spirogyra sp.</i>	11-21
Euglenophyta	<i>Euglena gracillis</i>	14-20
Haptophyta	<i>Prymnesium parvum</i>	22-38
Rhodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>	9-14
Dynophyta	<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	20
Bacillariophyta	<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
	<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
	<i>Chaetoceros sp.</i>	15,6 – 23,8
Haptophyta	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
	<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
	<i>Spirulina platensis</i>	4-9
	<i>Spirulina maxima</i>	6-7
Cyanobacteria	<i>Synechococcus sp.</i>	11
	<i>Anabaena cylindrica</i>	4-7

---

O uso de óleos provenientes de microalgas para a produção de biodiesel tem despertado muito interesse por ser fonte de energia limpa a um custo bastante competitivo (Schenk *et al.*, 2008). Os óleos microalgais são semelhantes aos óleos

vegetais e de peixes, por isso as expectativas sobre o biodiesel produzido a partir destes microrganismos são consideradas bastante promissoras (Ma *et al.*, 1999; Becker, 2004; Huerlimann, *et al.* 2010; Stuart *et al.* 2010; Huang, *et al.* 2010; Halim, *et al.* 2011).

As aplicações desses óleos podem ser inúmeras, mas destaca-se aqui o seu uso na produção de energia alternativa ao petróleo. Há mais de cinquenta anos a idéia da utilização de óleos microalgais para a produção de combustível vem sendo citada. Os processos fermentativos de massa algal para a produção de metanol e etanol estão entre os primeiros usos (Matsunga e Izumida, 1984 *apud* Richmond, 1988; Chisti, 2007, Schenk *et al.*, 2008).

As microalgas de maneira geral absorvem energia luminosa de comprimentos de onda entre 400 e 700nm absorvidos pelos pigmentos fotossintetizantes. As clorofilas, por exemplo, absorvem fótons na faixa do vermelho (650-680nm), do azul (400-450nm) e emitem fluorescência vermelha em lipossolventes. Os carotenóides (carotenos e xantofilas) absorvem luz azul e verde (430-500nm), transmitem amarelo e vermelho e são pouco fluorescentes (Round, 1973). A concentração de clorofila-a por célula é um importante indicativo do estado fisiológico das células mantidas em cultivos, onde inicialmente há uma redução na concentração do pigmento em função da disponibilidade de luz para as células, seguido por um aumento em função do auto-sombreamento celular decorrente do crescimento (Fogg & Thake, 1977; Piorreck *et al.* 1893; Agustí, *et al.*,1994; Solovchenko & Golderg., 2008).

A iluminação artificial de cultivos é utilizada para simular intensidades luminosas encontradas em ambientes naturais em faixas que permitam a realização da fotossíntese. As lâmpadas fluorescentes emitem pouco calor e possuem espectro similar a luz natural, embora predominantemente na faixa do laranja e vermelho. São utilizadas escalas que medem o fluxo luminoso (intensidade luminosa) ou que determinam o número de fótons que atingem uma superfície (iluminância ou

irradiância). As escalas usadas para medir o fluxo luminoso são: Lúmen (equivalente a 1/683 watt de luz), lux (igual a 1lúmem por m<sup>2</sup>) e “Foot candle” ou candelas, usados pela literatura mais antiga, que equivale a 10,76 lux. As medidas do número de fótons utilizados para a fotossíntese são: micro Einstein ( $\mu\text{E}$ ), micro moles ( $\mu\text{moles}$ ). A escolha das intensidades luminosas estão relacionadas, muitas vezes, com as espécies utilizadas e os objetivos de cada cultivo (Thin, 1983; Anderson *et al.*, 1997; Solovchenko & Golderg, 2008). É observada a utilização de irradiâncias de 20 à 200  $\mu\text{moles.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  em cultivos de microalgas (Converti, *et al.* 2009; Xin *et al.*, 2010). Além dos efeitos na taxa de crescimento, a intensidade luminosa também exerce efeitos na produção de carboidratos e lipídeos pelas microalgas (Zemke, *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010; Jian-Ming *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010; Solovchenko & Golderg, 2008). Os carboidratos de parede e de reserva originados a partir da fotossíntese são basicamente compostos de polissacarídeos e tanto as microalgas marinhas quanto as de água doce, por um processo metabólico natural, tendem a liberar, no meio, parte do carbono fotoassimilado na forma de compostos orgânicos dissolvidos. Vieira & Cáceres (1987) fizeram a comparação das taxas de excreção de carboidratos celulares em nove espécies de algas de água doce cultivadas em diferentes meios de cultura; os resultados mostraram que o aumento da excreção, com valores acima de  $1,0 \mu\text{g}.10^6$  células estiveram relacionados com a senescência da cultura pela exaustão ou ausência de determinados nutrientes que, conseqüentemente, impossibilitam a divisão celular. Em contrapartida, as menores taxas de excreção ( $< 0,01\mu\text{g}.10^6$  células) foram verificadas nos cultivos que apresentaram as maiores taxas de crescimento. A baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal e a adição de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo pode aumentar até sete vezes a produtividade da microalga (Ishida *et al.* 2000). Muradyan *et al.* (2004) verificaram um aumento de três vezes da concentração lipídica nos cultivos de *Dunaliella salina* com adição de CO<sub>2</sub>.

A síntese e o acúmulo de lipídeos em microalgas ocorrem tipicamente durante períodos de estresse relacionados à luz, temperatura e deficiência de nutrientes (Radmann & Costa, 2008). Em estudos realizados com microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, Piorreck *et al.* (1984) observaram um aumento no conteúdo lipídico dessas microalgas sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos. Em culturas de *Chlorella*, nas quais a divisão celular cessou devido à falta de nitrogênio no meio de cultura, o conteúdo lipídico das células aumentou de 28% para 70%, coincidente com um decréscimo no conteúdo protéico de 30% para 8% (Round, 1973).

Os lipídeos são produzidos durante todo o ciclo celular das microalgas. O carbono fixado por meio da fotossíntese é direcionado para a síntese de carboidratos e parte destes carboidratos é desviado para a síntese de lipídeos dos constituintes celulares e estoques de energia. O gliceraldeído-3-fosfato (GAP), precursor do piruvato, é formado, em reações de fixação de CO<sub>2</sub> e durante a via glicolítica no ciclo de Calvin ou a partir de outras fontes orgânicas de carbono. O GAP é exportado do cloroplasto ao citoplasma onde é utilizado na síntese de lipídios para a formação de ácidos graxos, na síntese de açúcares ou na oxidação a piruvato pela via glicolítica (Huang *et al.*, 2010). As microalgas usualmente apresentam uma pequena produção de lipídeos durante a fase exponencial de crescimento, com um aumento na síntese quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento (Darley, 1988). A produção de lipídios e as concentrações de diferentes ácidos graxos em microalgas parecem ser influenciadas principalmente pelas condições da cultura. Frequentemente o aumento no acúmulo de ácidos graxos é descrito como consequência aos efeitos da limitação de nutrientes no meio e à idade da cultura. Em condições limitantes de crescimento verifica-se uma queda na

divisão celular, na taxa fotossintética e na síntese de proteínas. A energia fotossintética é desviada da divisão celular para o acúmulo de carboidratos e síntese de lipídeos (Hu, *et al.* 2008), ocorrendo também um aumento da síntese de enzimas específicas para a absorção de nutrientes. Por outro lado, Huerlimann *et al.* (2010) verificaram um aumento do conteúdo de algumas classes lipídicas na fase exponencial do crescimento em cultivos de *Rhodomonas sp.* e *Isochrysis sp.* crescidas sob  $250 \mu\text{moles.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e meio K (Andersen *et al.*, 2005). A relação entre a intensidade luminosa e o aumento da produção de lipídeos parece ser mais que uma consequência do aumento da biomassa e do envelhecimento da cultura. Round (1973) observou que os íons contidos no interior de organelas e vacúolos podem variar consideravelmente e diferir do meio externo, em função do aumento da luz. Sabe-se também que a absorção de alguns íons pode ser maior na presença de luz que no escuro. O aumento da intensidade luminosa pode produzir modificações no pH, na concentração de  $\text{Mg}^{2+}$  e no NADPH do estroma dos cloroplastos, levando a um aumento da atividade de enzimas que modulam a síntese dos ácidos graxos (Sukenic *et al.* 1989; Jian-Ming, *et al.*, 2010 ).

O perfil lipídico entre as espécies marinha e de água doce apresenta semelhanças, variando apenas as proporções de cada ácido graxo. Os lipídeos neutros estocam energia para a célula, enquanto os lipídeos polares, glicolipídeos e os fosfolipídeos são partes estruturais de membranas celulares, além de participarem de atividades de modulação, por exemplo, em cloroplastos. Assim como para a maioria dos organismos, a síntese de ácidos graxos nas microalgas é inicialmente dirigida à formação das membranas celulares, organelas, cofatores enzimáticos, transportadores, mensageiros intracelulares e lipídeos de reserva. Os ácidos graxos

compreendem a maior fração de lipídeos, entre 25 a 60% dos lipídeos totais (Derner *et al.*, 2006).

Os lipídeos de reserva são derivados de ácidos graxos e, naturalmente ou sob condições de estresse, podem ser acumulados na forma de triacilglicerol (TAG). A principal via para a formação de TAG em microalgas é a mesma para vegetais superiores, através da incorporação de carbonos a partir da acetil-CoA na cadeia de ácido graxo em crescimento, utilizando adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos saturados ou poliinsaturados unidos por uma ligação éster a uma molécula de glicerol (Zemke *et al.* 2010). No início do crescimento, as clorofíceas produzem relativamente altas concentrações de lipídeos polares e poliinsaturados. Entretanto, em fase estacionária produzem predominantemente lipídeos neutros, naturalmente o produto de reserva (Piorreck *et al.*, 1984). Em espécies marinhas as maiores frações são constituídas de ácidos graxos poliinsaturados, em especial, o ácido aracdônico e o ácido eicosapentaenóico. Os ácidos graxos poliinsaturados (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA) também estão presentes em microalgas de água doce em proporções menores. No entanto, é importante ressaltar que o meio marinho é mais complexo do que o de água doce e as investigações acerca dos lipídeos interessantes para a produção de biodiesel é uma área relativamente nova. Além disso, espécies diferentes podem se comportar diferentemente também na produção de lipídeos, sendo necessários mais estudos com um número maior de espécies que possibilitem uma melhor comparação dos resultados com linhagens de água doce (Round, 1973; Rogers & Gallon, 1988; Liu *et al.*, 2010; Huerlimann *et al.*, 2010).

Os esforços de triagem e isolamento das linhagens adequadas para a produção de lipídeos interessantes para a conversão em biodiesel não devem estar restritos apenas à identificação e manutenção das linhagens promissoras para cultivo.

Não se sabe ainda sobre a viabilidade de cultivos em larga escala de muitos gêneros de microalgas, o que torna importante a investigação do comportamento fisiológico dirigido à produção de metabólitos específicos, frente às variáveis ambientais como intensidade luminosa, temperatura, pH, níveis de CO<sub>2</sub> e concentração de nutrientes. Tanto para aprimorar os conhecimentos da fisiologia destes organismos, quanto para fornecer linhagens com maior versatilidade metabólica.

## **1.2 – Biodiesel**

A resolução n.º 7, de 19 de março de 2008, da Agência Nacional de Petróleo e Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), e a Lei n.º 11.097, de 13 de janeiro de 2005, definem o biodiesel como “um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil”.

O termo biodiesel encontra-se registrado na “Environment protection Agency – EPA – USA”, como combustível e como aditivo para combustíveis e pode ser usado puro a 100% (B100), em mistura com o diesel de petróleo (B20), ou como aditivo a 5% (B5). Sua utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores do ciclo diesel, sem haver a necessidade de nenhuma modificação no motor (Costa Neto *et al.*, 2000).

A obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado, em qualquer parte do território nacional, foi estabelecida pela mesma lei (n.º 11.097) citada anteriormente e, de acordo com essa lei, o percentual obrigatório de biodiesel adicionado ao diesel deveria ser 5% até 2013. Em 27 de abril de 2009, por decisão do Governo Federal através do Conselho Nacional de Política

Energética (CNPE), foi aprovada a resolução que antecipou para janeiro de 2010 o aumento da mistura de biodiesel B5 no diesel fóssil.

Com a política do governo de antecipar metas, houve um aumento do uso do biodiesel no país. Segundo o site oficial da ANP, no ano de 2009 foram consumidos 1,26 bilhão de litros de biodiesel no país, 39% a mais que o ano de 2008. O balanço referente ao ano de 2010 ainda não foi divulgado, no entanto, espera-se o aumento deste consumo. A matriz energética brasileira ainda depende em grande parte de fontes não renováveis. De acordo com divulgação realizada pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE) em março de 2011, 52,8% da energia produzida no Brasil são provenientes de petróleo e seus derivados; 37,8% gás natural, 4,8% carvão mineral e 1,4% urânio e derivados. Além da dependência de fontes como essas não ser sustentável em longo prazo em função da capacidade de resposta pela indústria à demanda, os impactos ambientais causados pelos gases promotores do efeito estufa impõem para a sociedade o desafio de adotar idéias mais abertas em torno das tecnologias sustentáveis.

As principais matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel atualmente no Brasil são: soja, algodão, babaçu, palma, mamona e dendê (Ferrari *et al.* 2005). Outras oleaginosas vêm sendo testadas em plantas experimentais, como girassol, algodão, amendoim, nabo forrageiro e milho. Ainda que o cultivo destas oleaginosas tenha sido uma alternativa encontrada para a produção de biocombustíveis, existe um aspecto relevante, em torno desta prática: a competição de terras que poderiam ser utilizadas para a agricultura de alimentos. Sob este aspecto, o cultivo de microalgas visando à produção de biodiesel pode ser considerado promissor. Além do elevado potencial de produção de biomassa e óleo por algumas espécies, em condições adequadas, a produção é contínua e não segue regime de safras e também requerem menor área de cultivo (Teixeira e Morales, 2006). Os cultivos em larga escala podem ser realizados em região desértica, em solo degradado, uma vez que a demanda por

terra é utilizada apenas como suporte para o sistema de cultivo. O meio de cultivo é aquoso e pode ser reaproveitado, enquanto as fontes de carbono podem ser o CO<sub>2</sub> atmosférico, ou mesmo o residual de processos (Benemann, 1997). Outro aspecto interessante refere-se à sua capacidade de produzir elevadas quantidades de biomassa.

Em um levantamento realizado por Schenk *et al.*, (2008), foram realizadas comparações entre preços do barril de etanol, provenientes de cana de açúcar no Brasil e de milho nos Estados Unidos. O valor para ambos era estimado em 40 e 60 dólares, respectivamente. O barril equivalente de biodiesel de fontes não algais era estimado em 80 dólares (Schenk *et al.*, 2008). Entretanto, o custo do biodiesel algal, baseado em alguns estudos citados por esses autores, foi cotado entre 39 a 69 dólares o barril. Isso sugere que os custos da produção de biodiesel obtido a partir de microalgas poderiam ser compensados pela alta produtividade obtida. Porém, esses valores são baseados em uma projeção que ainda é pouco confiável, já que esta linha de investigação é bastante recente e necessita de um grande acréscimo de conhecimento. Ainda que o potencial biotecnológico das microalgas não seja uma novidade, o uso destes recursos requer, dentre a gama de conhecimentos necessários, os conhecimentos básicos das adaptações fisiológicas de linhagens de microalgas isoladas de ambientes brasileiros. Somente conhecendo-se essas adaptações às variações, por exemplo, de luz, temperatura e nutrientes, será possível aperfeiçoar as condições para o cultivo de uma dada linhagem para a produção adequada de lipídeos em cultivos de larga escala. Não há informações oficiais sobre o custo deste empreendimento por não existirem cultivos em larga escala para a produção de biodiesel. Atualmente os projetos apresentam altos custos de implantação e de produção de biomassa, superiores ao custo de produção das matrizes atualmente utilizadas (Stuart *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011).

Os estudos de bioprospecção são fundamentais para a seleção dos organismos mais promissores. Isolar, selecionar e caracterizar espécies nativas, além de aprimorar a busca de características específicas contribui tanto para o desenvolvimento de novos métodos de aquicultura, processos para colheita, extração e conversão do óleo (Sánchez, *et al.* 1999), quanto para o patenteamento de processos que utilizem linhagens de microalgas, conforme previsto pela Lei de Patentes Brasileira (Lei n.º 9.279, de 14 de maio de 1996).

## **2- Objetivos**

### **2.1- Objetivo geral**

Investigar a influência de intensidades luminosas na fisiologia da clorofícea *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01), através de variações no crescimento e na síntese de lipídeos em condições de cultivo fechado.

### **2.2 - Objetivos específicos**

- Testar os efeitos de três diferentes intensidades luminosas no crescimento celular, produção de carboidratos, concentração de pigmentos e produção de lipídeos, avaliando as modificações qualitativas nas diferentes fases do crescimento.
- Traçar o perfil de produção lipídica na linhagem testada, identificando os mais adequados para a produção de biodiesel.
- A partir deste estudo, propor a melhor condição de cultivo para essa linhagem para produção de lipídeos.

### **3 - Material e Métodos**

#### **3.1 - Experimento piloto**

Para a seleção da linhagem utilizada neste estudo, foram realizados testes preliminares com três linhagens de clorofíceas: *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01), *Chlorella* sp. (CHRF-01) e *Scenedesmus* sp. (SCRF-01), na intensidade luminosa de 1000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . As linhagens foram isoladas de amostras de água bruta do Reservatório do Funil, localizado no município de Rezende, no Rio de Janeiro, em 2006. Atualmente essas linhagens são mantidas na coleção do banco de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – LETC no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ.

Cada linhagem foi cultivada em Erlenmeyers com 1,5L de meio de cultivo ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964) na intensidade luminosa de 200  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  e fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, em fase exponencial de crescimento, alíquotas de cada cultura foram utilizadas como inóculo para os cultivos em 1000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . Os cultivos foram realizados em balões de vidro (Pyrex) contendo 2 L de meio ASM-1 com densidade celular inicial de, aproximadamente,  $1 \times 10^5$  céls.mL<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 12 horas e duração de 15 dias. O crescimento celular de cada linhagem foi acompanhado através da contagem do número de células em dias alternados. A produção de extrato bruto lipídico foi determinada em duas fases do crescimento: no 5º dia (fase exponencial) e 15º dia (fase estacionária).

##### **3.1.1. - Crescimento celular**

A partir da contagem do número de células realizada em microscópio ótico (Olympus BX-51) e hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, foi determinada a razão

máxima de crescimento, (R), que corresponde ao número máximo de células atingidas durante o cultivo dividido pelo número de células no inóculo (segundo a fórmula abaixo).

$$R = R_1 / R_0$$

Onde: R1= número máximo de células/mL; R0= número de células do inóculo.

A taxa de crescimento máxima ( $\mu$ ) de cada cultivo foi calculada no intervalo da fase exponencial de crescimento, segundo a equação descrita em Fogg & Thake (1987).

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / (t)$$

Onde:  $\mu$  = Taxa de crescimento; N= número de células do último dia da fase exponencial e  $N_0$  = número de células do início da fase exponencial; t= tempo de cultivo (dias).

### **3.1.2 – Extração dos lipídeos**

O extrato bruto lipídico foi obtido a partir da metodologia proposta por Folch (1956). Alguns ajustes ao protocolo foram necessários para que a metodologia se adequasse a realidade desse estudo, uma vez que o método foi inicialmente proposto para estudos utilizando tecido animal. No entanto, ressalta-se que este método é amplamente utilizado em estudos com plantas vasculares e microalgas, e as adaptações ao método são referentes ao processo de maceração da biomassa e ao tempo de extração do extrato lipídico.

Para uma melhor extração do conteúdo lipídico produzido pelas microalgas, a extração dos lipídeos foi realizada em duas etapas. Primeiro a biomassa liofilizada foi macerada manualmente com sílica gel (Merck) durante cinco minutos em clorofórmio e metanol nas proporções 2:1 (v/v). Esta mistura permaneceu em agitação por quatro horas em temperatura ambiente. A separação do resíduo celular da fase lipídica foi realizada por filtração em funil de vidro com filtro de sílica. O filtrado foi reservado e a biomassa retida no filtro foi submetida a uma segunda extração com clorofórmio e metanol nas proporções 1:2 (v/v). A mistura permaneceu em agitação por mais três horas e em seguida foi novamente filtrada. O segundo sobrenadante foi adicionado ao primeiro e após a retirada do solvente da mistura por evaporação obteve-se o extrato bruto lipídico. A massa do extrato bruto lipídico foi determinada por gravimetria em balança Mettler Toledo (AG245) com precisão de quatro casas decimais.



Figura 3: Etapas da extração dos lipídeos: (A) maceração da biomassa, (B) extração com solvente em mesa agitadora, (C) separação da biomassa celular após a extração

dos lipídeos, (D) éster bruto lipídico resultante da derivatização do extrato bruto lipídico.

### 3.2 - Experimento “Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e síntese de lipídeos por *Ankistrodesmus sp.*”

As altas intensidades foram reproduzidas no laboratório através de lâmpadas fluorescentes Philips, luz branca, de 20 e 40W. A medida da densidade do fluxo de fótons foi estimada através do uso de um sensor quântico acoplado a um integrador radiométrico (Li-Cor Inc., USA). A faixa de intensidade luminosa escolhida para este experimento teve a intenção de reproduzir intensidades reais encontradas em ambiente externo.

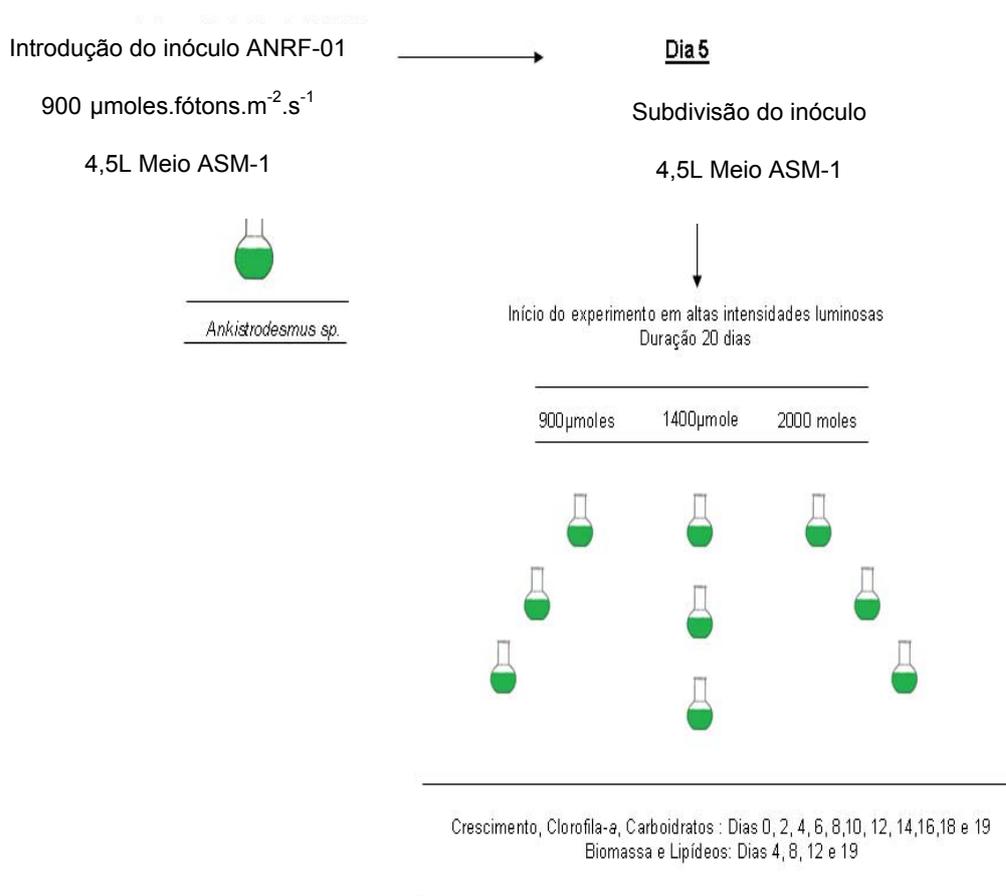


Figura 4: Esquema do experimento “Efeitos da intensidade luminosa sobre o crescimento e a síntese de lipídeos”.

Para a realização desse experimento, 2L da cultura da linhagem ANRF-01 foram previamente submetidas à intensidade luminosa de  $900 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  durante cinco dias - tempo necessário para que as células da cultura estoque estivessem em fase exponencial de crescimento. Em seguida essa cultura foi utilizada como in\u00f3culo e subdividida entre as tr\u00eas intensidades luminosas e suas respectivas triplicatas.

O in\u00f3culo de cada cultura apresentava uma densidade de, aproximadamente,  $1 \times 10^5$  c\u00e9ls/mL. As culturas foram mantidas em bal\u00e7\u00f5es de fundo chato contendo 4,5 L de meio de cultura ASM-1, pH inicial de 8,0, com aera\u00e7\u00e3o e sob fotoper\u00edodo de 12 horas. O experimento teve dura\u00e7\u00e3o de 20 dias e ao longo desse per\u00edodo o estado fisiol\u00f3gico das culturas foi acompanhado por amostragens em dias alternados para determina\u00e7\u00e3o do crescimento celular, concentra\u00e7\u00e3o de clorofila-a, produ\u00e7\u00e3o de carboidratos intracelulares e excre\u00e7\u00e3o de carboidratos extracelulares.

A penetra\u00e7\u00e3o da luz nos cultivos e a produ\u00e7\u00e3o de lip\u00eddeos foram acompanhadas em cinco fases do cultivo: nos 1\u00b0 e 4\u00b0 dias (fase exponencial de crescimento), 8\u00b0 dia (fase de desacelera\u00e7\u00e3o do crescimento), 12\u00b0 dia (fase estacion\u00e1ria) e ao final do experimento, no 19\u00b0 dia. A temperatura foi acompanhada ao longo dos 20 dias e o pH foi verificado no in\u00edcio e no final dos cultivos.



Figura 5: Arranjo do conjunto de lâmpadas fluorescentes usadas nos experimentos com intensidades luminosas iniciais de 900, 1300 e 2000  $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$  respectivamente.

### **3.3.1- Parâmetros físico-químicos**

#### **3.3.1.1 – Variação da temperatura**

Buscando verificar as possíveis alterações de temperatura decorrentes das variações de intensidades luminosas, as medidas de temperatura foram realizadas diariamente ao longo de todo o cultivo, dentro de balões contendo o mesmo volume de meio dos experimentos e nas mesmas intensidades luminosas através de um termohigrômetro digital (Impac).

#### **3.3.1.2 - Determinação do pH**

Os valores de pH do meio de cultivo foram determinados durante o preparo do meio de cultivo e ao final dos cultivos, com o auxílio de potenciômetro (Micronal B474), acoplado a um eletrodo Analyse calibrado na faixa 4,0 e 7,0 à temperatura ambiente.

#### **3.3.1.3 – Atenuação da intensidade luminosa**

Para estimar a perda progressiva da irradiância no interior das culturas decorrente do crescimento da cultura ao longo dos cultivos, foram reproduzidas as condições experimentais (densidades celulares, volumes dos cultivos e intensidade luminosa) observadas nos dias 0 (inóculo), 4º, 8º, 12º e 19º. Esta análise permitiu estimar a irradiância que chegou ao interior dos cultivos em cada intensidade luminosa testada, nas mesmas condições em que foram colhidas as amostras para a realização das análises deste estudo. As medidas de irradiância no interior dos cultivos foram tomadas nos primeiros centímetros do meio de cultivo, na região central da cultura,

através de um sensor quântico acoplado a um integrador radiométrico esférico (Li-Cor Inc., USA) em cada condição experimental testada.

### **3.3.2 - Parâmetros fisiológicos**

#### **3.3.2.1- Crescimento celular**

A densidade de células foi determinada como descrito no item 3.1.1, assim como a razão máxima de crescimento e a taxa de crescimento alcançada pela microalga nas diferentes intensidades luminosas testadas.

#### **3.3.2.2 – Obtenção da biomassa**

Foram recolhidos 500 mL de cultura nos dias 0, 4, 8, 12 e 19 de cada cultivo. Os sais do meio foram retirados através de centrifugação a 3000g durante 8 minutos (Eppendorf - modelo 5403) e lavagens com água ultrapura (MiliQ). Essa etapa foi repetida três vezes. A biomassa resultante foi congelada através do sistema de congelamento em camadas utilizando o equipamento Shell-freeze (LABCONCO) e a secagem da mesma ocorreu através do processo de liofilização.

O peso seco da biomassa foi determinado por gravimetria e a produtividade da biomassa durante a fase exponencial do crescimento foi calculada através da seguinte equação:

$$P_{\text{biom}} (\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}) = \text{Biom}_f - \text{Biom}_i / T$$

Onde:  $\text{Biom}_f$  = biomassa final,  $T_{19}$  ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{Biom}_i$  = biomassa inicial,  $T_0$  ( $\text{g.L}^{-1}$ );  
T= tempo de cultivo (dias).

#### **3.3.2.3 - Variação da concentração de clorofila-a**

Para a determinação do conteúdo de clorofila-a, 5,0 mL de cada cultura foram concentrados em filtro de borosilicato com diâmetro de 13mm. Os filtros foram macerados e submetidos à extração com 10,0 mL de acetona 90% e, posteriormente, homogeneizados em vórtex. O período de incubação foi de 12 horas no escuro e posteriormente os homogenatos foram centrifugados a 2500g por 15 min. As leituras das absorbâncias dos sobrenadantes foram feitas por espectrofotometria, (Shimadzu - UV Mini 1240), em 665 para clorofila-a e 750nm para correção da turbidez. As concentrações de clorofila-a foram determinadas de acordo com as equações propostas por Lorenzen,(1967):

$$[\text{Chl } a] \mu\text{g.L}^{-1} = 26,73 \cdot F \cdot v / V \cdot 1$$

Onde: F=  $\text{DO}_{665} - (\text{DO}_{750} + \text{DO}_{\text{branco}})$  , antes de acidificar; v= volume da acetona em mL, V= volume do filtrado em L; 1= distância óptica da cubeta

As concentrações de clorofila-a foram obtidas em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e convertidas para  $\mu\text{g.10}^{-5}$  células.

#### **3.3.2.4 - Extração e determinação das concentrações de carboidratos**

A determinação da concentração de carboidratos intracelular e extracelular foi realizada pelo método descrito por Dubois *et al.* (1956) e adaptado para organismos fitoplanctônicos por Myklestad & Haug (1972).

As culturas foram filtradas em filtros de borosilicato com diâmetro de 13 mm, previamente calcinados a 400°C, em forno mufla durante 4h. Como a extração e a análise não foram realizadas imediatamente após a amostragem, alguns procedimentos para conservação e preservação das amostras foram realizados. Desta forma, após a filtragem de cada amostra, os filtros contendo as células da microalga foram mantidos em tubos de ensaio a uma temperatura de -20°C e o filtrado resultante

foi mantido em frasco de vidro a 4°C conservados com azida sódica a 0,05%, até o momento da análise.

Para a extração dos carboidratos intracelulares, aos filtros foram adicionados 1,0 mL de ácido sulfúrico 80% com um período de incubação de 20 horas em temperatura ambiente. Após este período, a reação foi interrompida com 6,0 mL de água ultra pura em banho de gelo. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL desse extrato e acrescentados 1,0mL de fenol 5% e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos para reação e resfriamento da solução, a leitura da densidade óptica foi feita por espectrofotometria (Shimadzu –uv mini 1240) em 485 nm.

A análise dos carboidratos extracelulares foi feita a partir de alíquotas de 1,0mL do filtrado, onde foram acrescentados 0,25 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, a leitura em 485nm ocorreu após o resfriamento da solução em banho de gelo. A quantificação dos carboidratos intracelulares e extracelulares foi realizada através de uma curva padrão de glicose (MERCK) nas concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . Os resultados foram obtidos em  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e convertidos para  $\mu\text{g}.\text{10}^{-5}$  células.

### 3.3.2.5 - Extração dos lipídeos

As extrações dos lipídeos a partir da biomassa liofilizada foram realizadas conforme descrito no item 3.1.2 e a produtividade lipídica do extrato bruto lipídico foi calculada segundo a equação sugerida por Lepage & Roy (1984).

$$P_{\text{Lipid}} (\text{g}.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = C_f \times \text{DCW}_f - C_i \times \text{DCW}_i / T$$

Onde:  $P_{\text{Lipid}}$  = produtividade lipídica; e  $C_f$  = conteúdo lipídico final e  $\text{DCW}_f$  = biomassa final;  $C_i$  = conteúdo lipídico inicial e  $\text{DCW}_i$  = biomassa inicial; T= tempo de cultivo (dias).

O extrato obtido foi denominado extrato bruto lipídico porque nele não estão contidos somente lipídeos, mas também uma gama de moléculas com afinidade aos solventes utilizados na extração.

### **3.3.2.6 – Metilação dos ésteres de ácidos graxos**

Os extratos brutos lipídicos no que concerne aos ésteres de ácidos graxos, resultantes da extração, foram saponificados e re-esterificados com metanol segundo adaptação do método proposto por Joseph & Ackman (1992). Primeiro, ao extrato lipídico foi acrescentada uma base forte ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em metanol e a mistura foi aquecida em banho-maria por 5 minutos. Após resfriar até temperatura ambiente, foi adicionado o agente metilante Borotrifluormetano ( $\text{BF}_3$ ) 12% em metanol e a mistura foi novamente aquecida por 50 minutos. Em seguida, foi adicionada à mistura uma solução de cloreto de sódio saturada formando assim uma emulsão. Estas etapas correspondem à saponificação e conseqüente metilação dos ácidos graxos contidos no extrato bruto lipídico. Em seguida foram adicionados 10,0mL de N-Hexano 85% e a emulsão foi agitada em vórtex. Após a separação das fases, a fase lipídica contendo os ésteres de ácidos graxos foi recolhida, seca sob atmosfera de nitrogênio e reservada para as análises por cromatografia gasosa.

A produtividade dos ésteres de ácidos graxos foi calculada da mesma forma que foi calculada a produtividade do extrato bruto lipídico, conforme descrito no item 3.3.2.5.

### **3.3.2.7 - Caracterização e quantificação dos ésteres por CG**

Os ésteres de ácidos graxos obtidos pela esterificação do extrato bruto lipídico foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização de

chama (DIC), Agilent Technologies 7890A Autosampler 7693. Foi utilizada uma coluna capilar modelo Carbowax com comprimento de 25m, diâmetro interno de 250  $\mu\text{m}$  e 0.25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. O modo de injeção utilizado foi split com divisão de fluxo 40:1. O gás de arraste utilizado foi Hélio com fluxo de 12 PSi e o volume de injeção foi de 1,0 $\mu\text{l}$ . As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C, com isoterma de 200 °C durante 25 minutos. A quantificação dos ésteres foi realizada com uma faixa de trabalho de 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 40,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com método de padronização externa onde foi avaliada a resposta do analito em relação aos padrões de referência. Os padrões analíticos, (Sigma Aldrich), utilizados foram: C18:0 (ácido esteárico), C18:1n-9 (ácido oléico), C18:2n-6 (ácido linoléico), C16:0 (ácido palmítico), C12:0 (ácido dodecaenóico ou ácido láurico), C17:0 (ácido metil-heptadecanoato ou margarato de metilo), C11:0 (ácido undecaenóico ou ácido cáprico) e C20:1 (ácido cis-eicosaenóico ou ácido gondóico). A curva de calibração foi feita com cinco concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a injeção de cada ponto da curva foi realizada em triplicata. O limite de quantificação (L.Q.) desse procedimento foi de 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o limite de detecção do método foi de 0,01  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **3.4 - Análises estatísticas dos resultados**

Para verificar a influência das diferentes intensidades luminosas nas variáveis analisadas ao longo dos experimentos foi realizada uma análise de variância (ANOVA). As variações que apresentaram diferenças significativas foram submetidas ao teste de comparação múltipla de Tukey. Estas análises foram feitas utilizando o programa estatístico SPSS® 17.0.

## **4- Resultados e discussão**

### **4.1 - Experimento piloto**

#### **4.1.1 - Crescimento e produção lipídica**

A produção de lipídeos verificada pela massa de extrato bruto lipídico foi analisada em duas fases do crescimento: durante a fase exponencial (5º dia) e na fase estacionária (15º). *Ankistrodesmus* sp. apresentou a maior produção de extrato bruto lipídico entre as microalgas testadas. Em média, durante a fase exponencial, a produção lipídica por *Ankistrodesmus* sp. foi 2,3 vezes maior que em *Chlorella* sp. e 3 vezes maior que em *Scenedesmus* sp. Na fase estacionária do crescimento, *Ankistrodesmus* sp. também apresentou maior produção lipídica, em média 1,7 vezes a mais que as demais linhagens testadas. Os resultados foram determinantes para a escolha da espécie *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01) no experimento seguinte.

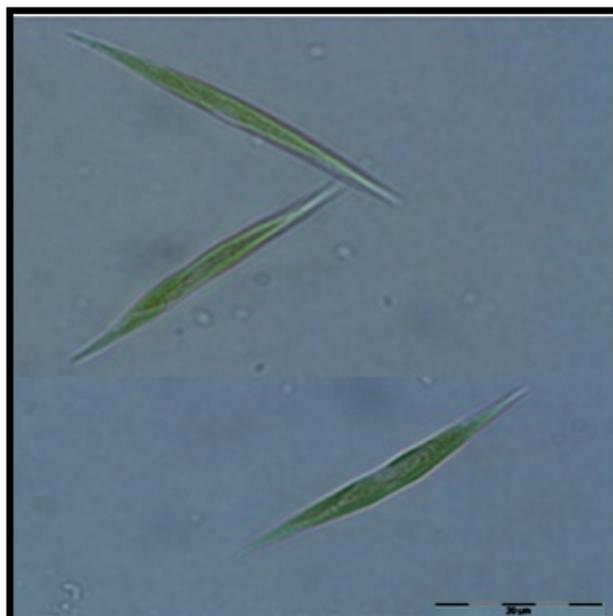


Figura 6: Micrografia em microscopia óptica (campo claro) de *Ankistrodesmus* sp. (ANRF-01) após 12 dias de cultivo em  $900\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ , aumento de 1000x.

#### 4.2 - Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e síntese de lipídeos por *Ankistrodesmus* sp.

##### 4.2.1 - Variação da temperatura no interior dos cultivos

As temperaturas máxima e mínima alcançadas foram bastante similares entre os tratamentos em 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2}.s^{-1}$  e permaneceram estáveis durante todo o cultivo.

Tabela III: Variações da temperatura nos cultivos sob diferentes intensidades luminosas.

Intensidade luminosa $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2}.s^{-1}$	Temperatura	
	Máxima	Mínima

900	23,2 (± 0,24)	20,3 (± 0,30)
1400	23,7 (± 0,16)	20,3 (± 0,35)
2000	25,3 (± 0,38)	20,6 (± 0,27)

#### 4.2.2 – pH

Tabela IV: Valores de pH do meio ASM-1 e no 19º dia de cultivo, nas três intensidades luminosas testadas.

Intensidade luminosa $\mu\text{moles f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	pH	
	Meio do cultivo	Fim do cultivo
900	8,0 (±0,01)	10 (±0,11)
1400	8,0 (±0,01)	10 (±0,19)
2000	8,0 (±0,01)	10 (±0,12)

Os resultados mostraram que, em comparação ao pH inicial do meio, aumento do número de células levou ao aumento do pH, conforme verificado no 19º dia de cultivo. No entanto, não houve diferença nos valores de pH entre as intensidades luminosas testadas.

#### 4.2.3 - Atenuação da intensidade luminosa

Tabela V: Intensidade luminosa, a partir do inóculo de *Ankistrodesmus* sp. até o 19º dia de cultivo medida no interior dos cultivos.

Medidas das intensidades luminosas no interior dos balões de cultivo

$\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

	ASM-1	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 19
900 $\mu$ moles	915( $\pm$ 99)	841( $\pm$ 86)	328( $\pm$ 16)	89 ( $\pm$ 8)	64( $\pm$ 4)	53 ( $\pm$ 1)
1400 $\mu$ moles	1449( $\pm$ 41)	1318( $\pm$ 79)	402( $\pm$ 8)	106 ( $\pm$ 2)	77( $\pm$ 3)	62 ( $\pm$ 1)
2000 $\mu$ moles	2027( $\pm$ 27)	1782( $\pm$ 65)	541( $\pm$ 23)	128( $\pm$ 6)	92( $\pm$ 5)	78 ( $\pm$ 1)

Valores referentes às medidas de superfície (2cm) no interior dos cultivos.

A tabela V apresenta os resultados da diminuição progressiva do número de fótons no interior das culturas ao longo dos cultivos. As intensidades luminosas aplicadas em estudos fisiológicos com microalgas variam, de um modo geral, em função do objetivo e do organismo em estudo, uma vez que a tolerância a luz muda entre a extensa variedade de espécies, formas, habitats e origem (Agustí *et al.*, 1994). Uma limitação importante entre as comparações dos resultados obtidos neste estudo e os apresentados pela literatura se fez em decorrência de grande parte dos trabalhos publicados utilizarem escalas de irradiância menores do que as aplicadas neste estudo, correspondendo, muitas vezes, a 10% ou menos da intensidade de 1400  $\mu$ moles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. As discussões sobre a questão da luz em estudos fisiológicos não são um assunto novo. Sorokin & Krauss (1957) já chamavam a atenção para as escalas aplicadas em experimentos de laboratório com microalgas, sugerindo que as irradiâncias estariam muito abaixo das encontradas em ambientes naturais.

O aumento inicial e posterior perda progressiva na disponibilidade do número de fótons observados neste estudo obedeceram às mesmas influências observadas na penetração da luz de modo geral. A luz que penetrou a coluna d'água foi modificada pela absorção e espalhamento da água por si mesma e pela presença de partículas dissolvidas (Falkowski & Raven, 2007). Em sistemas de cultivos fechados os efeitos da reflexão e espalhamento da luz no interior de culturas parecem ser conduzidos pelo formato do frasco, posicionamento das lâmpadas e a densidade da cultura

(Grobbelaar, 2003). Como era esperado, o aumento da biomassa promoveu o auto sombreamento das células nos cultivos. Estudos realizados por Passarge *et al.* (2006), com linhagens de clorófitas e cianobactérias em monoculturas, verificaram que o aumento da densidade da população resultou na diminuição progressiva da penetração da luz que chegava às culturas até o estado estacionário dos cultivos, que ocorreu, de um modo geral, a partir do 12º dia. No presente estudo, esta foi uma resposta importante que mostrou que as intensidades inicialmente assumidas não refletem de fato a quantidade de fótons recebidos pelas células durante o desenvolvimento dos cultivos. As intensidades luminosas permaneceram realmente altas somente até o 4º dia de cultivo.

#### **4.2.4 - Curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp.**

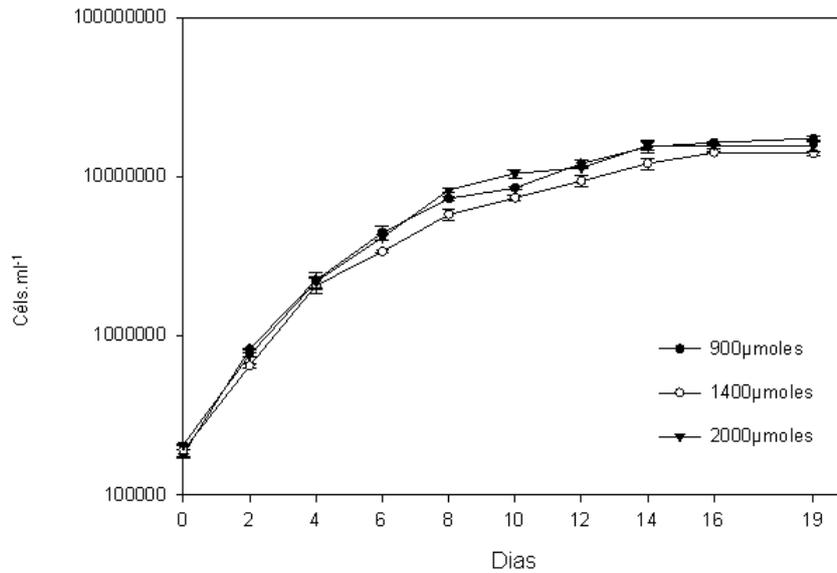


Figura 7: Curvas de crescimento de *Ankistrodesmus* sp. (ANFR-01) submetida a três intensidades luminosas: 900, 1400 e 2000 μmoles fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

As curvas de crescimento (Figura 7) mostraram que as culturas cresceram de forma exponencial a partir do dia do inóculo até o 4º dia de cultivo e, então, entraram em desaceleração, atingindo a fase estacionária entre o 8º e 10º dia de cultivo. Embora o crescimento da microalga nas diferentes intensidades luminosas testadas tenha apresentado um desenho bastante semelhante, a análise do número máximo de células nas condições testadas revelou que, em comparação ao tratamento iniciado em 900 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, o crescimento na intensidade de 1400 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> foi menor (p=0,001) refletindo um menor número de células ao final dos cultivos.

Não foram verificadas diferenças no crescimento celular entre o tratamento de 2000 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e o tratamento iniciado em 900 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Tabela VI: Valores da curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp. Média entre as triplicatas seguidas do erro padrão. N<sub>0</sub> e N<sub>máx</sub>: densidade celular inicial e

máxima,  $\mu$ : taxa de crescimento, R: razão máxima de crescimento; \* indica diferença significativa (P=0,028).

Parâmetros	Intensidades luminosas		
	$\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
	900 $\mu\text{moles}$	1400 $\mu\text{moles}$	2000 $\mu\text{moles}$
$N_0$ ( $\times 10^5$ células.mL <sup>-1</sup> )	1,8	1,9	2
$N_{\text{m\acute{a}x}}$ ( $\times 10^5$ células.mL <sup>-1</sup> )	176,6 ( $\pm 3,3$ )*	140 ( $\pm 4,5$ )	155,6 ( $\pm 11$ )
$\mu$	0,62 ( $\pm 0,01$ )	0,59 ( $\pm 0,03$ )	0,58 ( $\pm 0,02$ )
R	96,3 ( $\pm 3,6$ )*	74,9 ( $\pm 7,6$ )	75,4 ( $\pm 5,7$ )
Intervalo da fase exponencial (dias)	0-4	0-4	0-4

A taxa de crescimento variou entre  $0,62 \pm 0,01$  e  $0,58 \pm 0,02$  (nos cultivos realizados em 900 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e  $0,59 \pm 0,03$  no cultivo realizado na intensidade de 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Tabela VI). Não houve diferença significativa entre as taxas de crescimento e no intervalo da fase exponencial de crescimento, com o aumento das intensidades luminosas.

Os requerimentos básicos para o crescimento das microalgas são os mesmos que para a maioria dos vegetais superiores: água, luz e compostos inorgânicos (Fogg & Thake, 1987). O que variam são as respostas fisiológicas das microalgas à flutuação destes fatores. As adaptações à luz, por exemplo, além de específicas ao organismo, podem variar em diferentes escalas de tempo (Padisak, 2008).

Os resultados sobre o crescimento da microalga testada mostraram que as altas intensidades aplicadas não foram suficientemente altas para inibir o crescimento, ao contrário, os cultivos cresceram de forma logarítmica até a capacidade máxima suportada no meio. Foi reportada para uma linhagem de *Ankistrodesmus gracilis*

cultivada na irradiância de  $24 \mu\text{E fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  uma taxa de crescimento de 0,36 (Sipaúba-Tavares et al, 2008). Comparativamente, a taxa apresentada por estes autores foi menor do que as taxas obtidas nas diferentes condições de irradiância testadas neste estudo.

#### 4.2.5 – Produção de biomassa

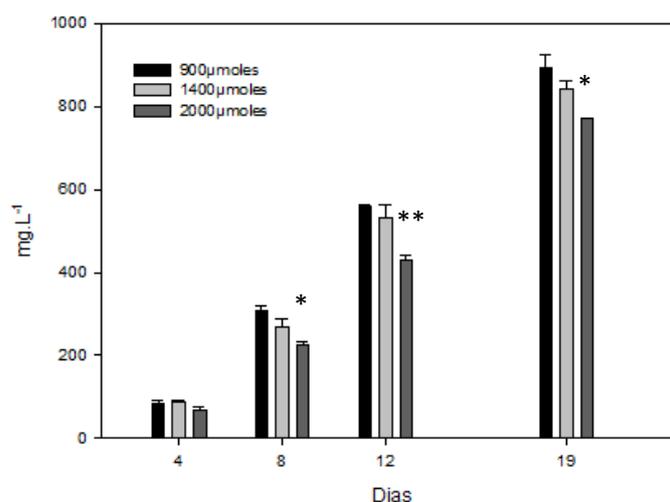


Figura 8: Valores médios da biomassa seca produzida por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas de 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Diferenças significativas: \*( $p < 0,05$ ) e \*\*( $p < 0,01$ ).

As intensidades luminosas que geraram os maiores rendimentos em biomassa foram, nesta ordem, em 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os cultivos em 900 e 1400  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  apresentaram resultados bastante próximos, enquanto que no tratamento em 2000  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  foram verificadas reduções significativas em relação ao tratamento em 900  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Figura 8) a partir do 8º dia de cultivo ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). As células nessa intensidade luminosa produziram em média 21% menos biomassa que a condição em 900  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , no final de 20 dias. A produtividade da biomassa nos cultivos em 900 e 1400  $\mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  alcançou valores de 0,15 e 0,18  $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente, enquanto na intensidade

de 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  a produtividade foi em média de  $0.13\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . As diferenças encontradas na produção de biomassa entre as irradiâncias testadas tiveram início a partir do 8º dia. No entanto, essa variação em termos de produtividade de biomassa foi muito pequena ( $0,01\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) não alcançando significância estatística e, visto que um dos objetivos do trabalho é indicar a melhor condição para produtividade de biomassa, em cultivos de larga escala pode-se afirmar que as três intensidades luminosas testadas mostraram-se promissoras.

#### 4.2.6 – Variação no conteúdo de clorofila-a

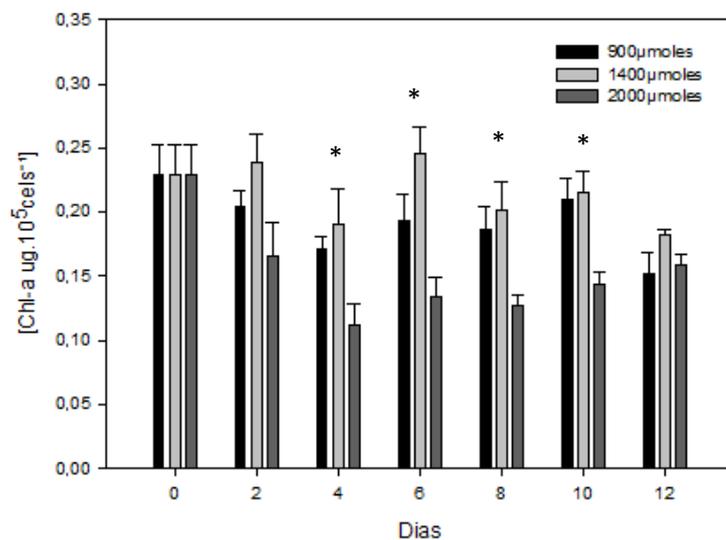


Figura 9: Variação da concentração de clorofila-a em  $\mu\text{g}.10^5.\text{cél}^{-1}$  nos cultivos de *Ankistrodesmus* sp. em 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ . Diferença significativa: \* ( $p < 0,05$ ).

As adaptações às intensidades luminosas pelos organismos fotossintéticos são efetuadas principalmente pela variação do conteúdo de pigmentos nas células. A Figura 9 mostrou que houve variação na concentração de clorofila-a tanto em função do tempo de cultivo (ANOVA  $F_{(8,51)}=36,3$ ,  $p < 0,0001$ ), quanto da intensidade luminosa aplicada ( $p < 0,05$ ). De um modo geral, foi observada a mesma tendência ao longo do

crescimento nas três intensidades testadas. Primeiro ocorreu uma diminuição no conteúdo de clorofila-*a*, durante a fase exponencial do crescimento seguida por um aumento a partir do 6º dia de cultivo. Foram observadas oscilações nas três intensidades luminosas testadas até o 12º dia de cultivo. As maiores concentrações de clorofila-*a* foram alcançadas a partir do 6º dia no tratamento em 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , em média a concentração foi 15,6% maior que no tratamento em 900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . O tratamento em 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  apresentou as menores concentrações de clorofila-*a* durante todo o experimento, ressaltando a idéia de que quanto maior a intensidade luminosa em que o organismo está submetido, menor a necessidade de produção de pigmentos fotossintetizantes (Darley, 1982). As modificações no conteúdo total de pigmentos por célula refletem em geral a aclimatação do aparato fotossintético das microalgas em função das condições de cultivo (Richardson *et al.* 1983). A redução na concentração de clorofila-*a* a partir do 10º dia de cultivo pode ser decorrente da fase do cultivo, uma vez que nesse momento as culturas já haviam atingido a capacidade suportada pelo meio e encontravam-se em fase estacionária de crescimento. Estes resultados são coerentes com os apresentados pela literatura, nos quais as concentrações de clorofila-*a* tendem a diminuir em estado estacionário de crescimento. Piorreck *et al.* (1984) verificaram em monocultivos de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*, uma queda na concentração de clorofila-*a* das células durante a diminuição dos níveis de nitrogênio disponíveis na cultura.

De maneira geral os organismos fotossintetizantes podem aumentar a fração absorvida da luz incidente através do aumento da concentração de clorofila-*a* (Margalef 1980 *apud* Agustí, 1994; Björkman,1981). O conteúdo de clorofila-*a* presente nos tecidos fotossintéticos é, no entanto, apenas um indicativo do potencial de uso da luz absorvida para fotossíntese (Duysens, 1956 *apud* Agustí, 1994).

#### 4.2.7 – Produção e excreção de carboidratos

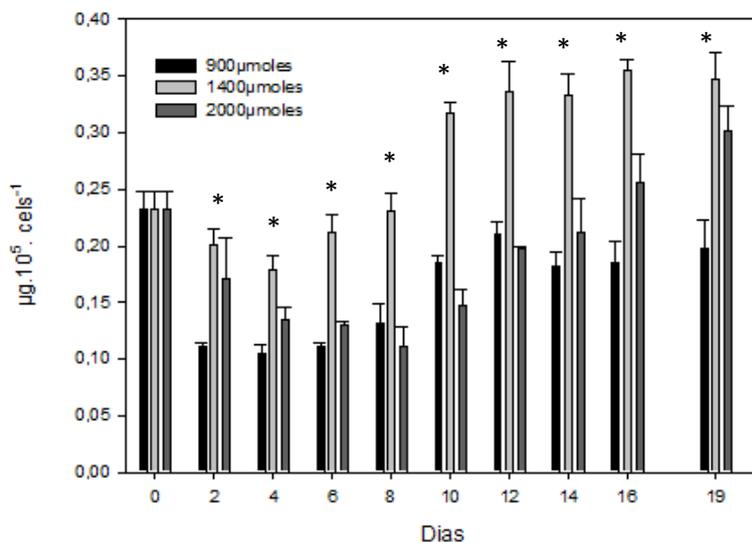


Figura 10: Variação do acúmulo de carboidratos intracelulares por *Ankistrodesmus sp* em  $\mu\text{g}.10^5 \text{cél}^{-1}$  intensidades luminosas testadas. Diferença significativa:  $*(p < 0,05)$ .

Foi verificado que o acúmulo de carboidratos intracelulares variou durante o crescimento dos cultivos. Houve uma diminuição inicial dos carboidratos intracelulares a partir do 2º dia de cultivo nas três intensidades luminosas. Esta diminuição foi importante para a intensidade de 900  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  que apresentou os menores valores ao longo do cultivo. Foi significativo o aumento no acúmulo de carboidratos pelas células cultivadas na intensidade de 1400  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ( $p < 0,01$ ). Os cultivos em 1400  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  apresentaram significativamente as maiores concentrações de carboidratos intracelulares em relação aos outros tratamentos testados, indicando que houve uma alteração no estado fisiológico nesta condição de irradiância que favoreceu o acúmulo de produtos fotoassimilados.

Em organismos fotossintetizantes, os carboidratos são considerados produtos resultantes da fase escura da fotossíntese. Em altas intensidades luminosas, a fixação do carbono pode exceder a taxa de síntese protéica (limitada pela assimilação de

nitrogênio), levando a incorporação do excesso de carbono fixado sob a forma de carboidratos e seus derivados (Konopka e Schnur, 1980 *apud* Darley, 1982).

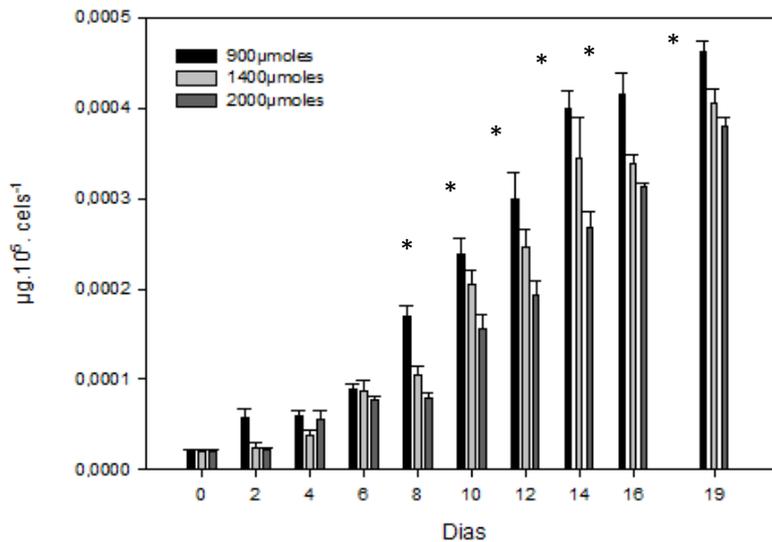


Figura 11: Variação dos carboidratos extracelulares em  $\text{mg} \cdot 10^5 \text{ cél}^{-1}$  excretados por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas testadas. Diferença significativa:  $*(p < 0,01)$ .

A excreção de carboidratos foi observada durante todo o cultivo. Foi verificado um aumento constante dessa excreção e também uma diferença importante no conteúdo excretado pelas células cultivadas na intensidade de  $900 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) em relação às demais intensidades testadas. O maior conteúdo excretado ocorreu na intensidade de  $900 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e o menor conteúdo foi verificado na intensidade de  $2000 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

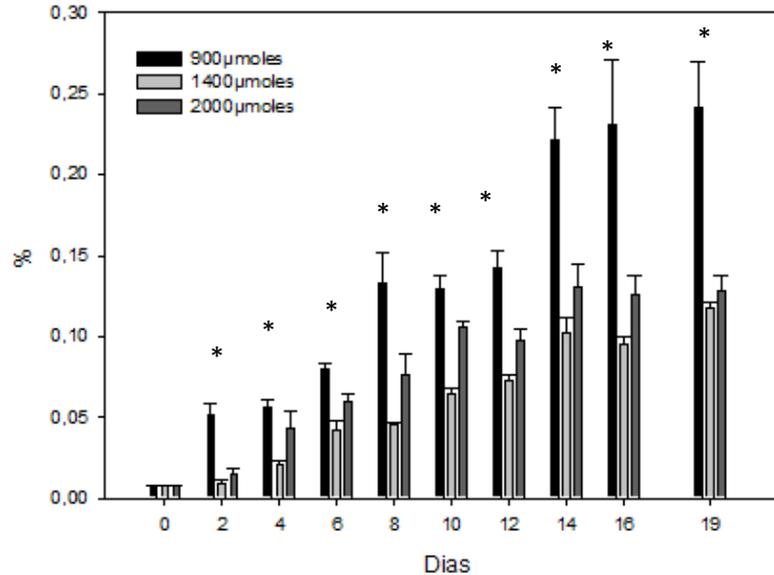


Figura 12: Variação do percentual de carboidratos excretados em relação ao conteúdo de carboidratos intracelulares por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas testadas. Diferença significativa: \* ( $<0,05$ )

As maiores porcentagens de carboidratos excretados em relação aos carboidratos acumulados ocorreram durante os cultivos em  $900 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Nesta condi\u00e7\u00e3o a rela\u00e7\u00e3o percentual variou entre 0,008% e 0,24% seguidos pelos cultivos em  $2000 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  com 0,008% e 0,11% e  $1400 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  0,008% e 0,12%, o que representa percentuais dentro da faixa de normalidade para essa excre\u00e7\u00e3o, que \u00e9 esperada ocorrer naturalmente em valores de at\u00e9 10% do carbono fotossinteticamente fixado.

A libera\u00e7\u00e3o de carboidratos no meio de cultura \u00e9 um processo natural. Entretanto, \u00e9 assumido que qualquer fator que leve a um crescimento sob estresse, mas que permita a realiza\u00e7\u00e3o da fotoss\u00edntese tende a aumentar as taxas de excre\u00e7\u00e3o (Vieira & C\u00e1ceres, 1987). Acredita-se que a excre\u00e7\u00e3o de carboidratos extracelulares \u00e9 maior em condi\u00e7\u00f5es onde as esp\u00e9cies n\u00e3o apresentaram as melhores taxas de rendimento e, tamb\u00e9m, na fase estacion\u00e1ria do crescimento, sugerindo que este efeito estaria relacionado, entre outros fatores, \u00e0 exaust\u00e3o de nutrientes (Vieira & C\u00e1ceres,

1987; Vieira & Myklestad, 1986). As maiores taxas de excreção em cultivos de *Ankistrodesmus densis*, ocorreram em situações de menor crescimento (Vieira & Cáceres, 1987). No entanto, no presente estudo não foi possível fazer uma correlação clara como esta, de causa e efeito (crescimento e excreção).

A condição em que foi verificado maior excreção de carboidratos (900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ ) não apresentou diferença na razão de crescimento entre as intensidades testadas, no entanto os cultivos nesta condição apresentaram as menores concentrações de carboidratos intracelulares, o que indica que um maior percentual de carbono fotossinteticamente fixado foi excretado para o meio de cultivo.

## 4.2.8 – Produção de Lipídeos

### 4.2.8.1 – Extrato bruto lipídico

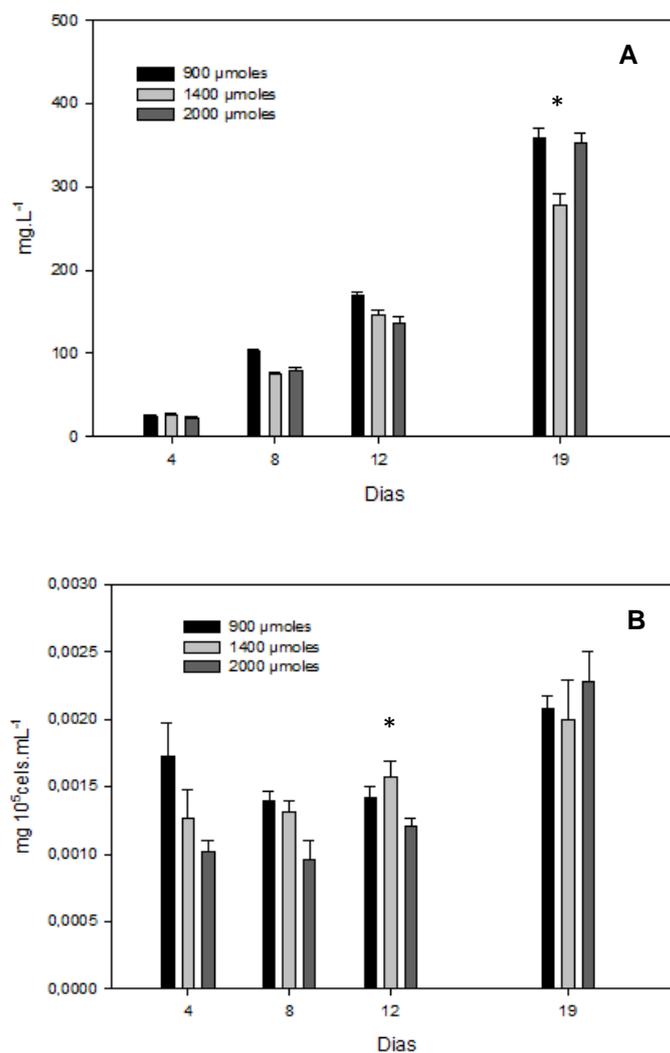


Figura 13: Variação da massa dos extratos brutos lipídicos em  $\text{mg.L}^{-1}$  (A) e  $\text{mg.}10^5 \text{ céls}^{-1}$  (B) produzidos por *Ankistrodesmus* sp. nos cultivos em 900, 1400 e 2000  $\mu\text{moles}$  fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Diferença significativa:  $(p < 0,05)$ .

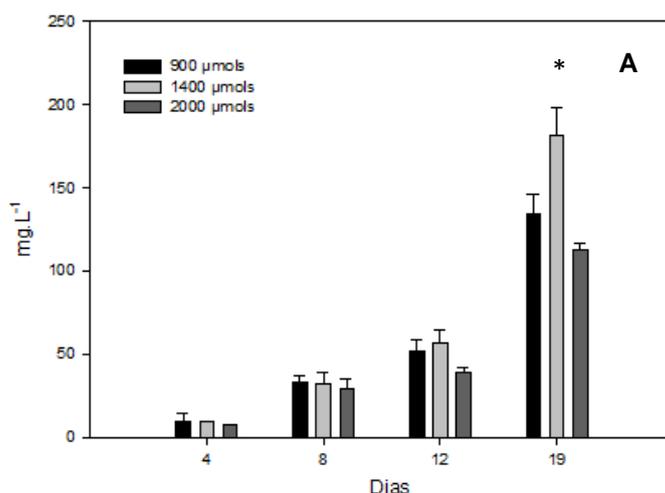
A figura 13 mostra a variação do conteúdo lipídico da microalga entre as intensidades luminosas, em função do tempo de cultivo. Foi verificado o aumento deste conteúdo ao longo de todo o cultivo. Não houve diferença na produção do extrato bruto lipídico entre as intensidades, no 4º dia de cultivo mas, a partir do 8º dia

de cultivo, o tratamento em 900  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  apresentou uma tend\u00eancia de aumento at\u00e9 o 12\u00b0 dia em rela\u00e7\u00e3o as demais condi\u00e7\u00f5es testadas.

No entanto, quando os resultados foram expressos por  $10^5$  c\u00e9ls.mL<sup>-1</sup>, que indicam a massa de lip\u00eddeos por 100.000 c\u00e9lulas, mostraram que a varia\u00e7\u00e3o da massa lip\u00eddica no tratamento de 900  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  tendeu a diminui\u00e7\u00e3o at\u00e9 o 12\u00b0 dia de cultivo, seguido por uma recupera\u00e7\u00e3o no 19\u00b0 dia. Os tratamentos em 1400 e 2000  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  apresentaram uma tend\u00eancia de aumento durante todo o per\u00edodo de cultivo.

Em termos percentuais n\u00e3o foram verificadas diferen\u00e7as significativas entre os tratamentos em 900 e 2000  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  para os valores da massa do extrato bruto lip\u00eddico. Estas corresponderam em m\u00e9dia a 40% e 46% da biomassa total respectivamente. No tratamento em 1400  $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  foi verificada um percentual significativamente menor ( $p=0,047$ ) de 33%.

#### 4.2.8.2 – \u00c9steres met\u00edlicos de \u00e1cidos graxos



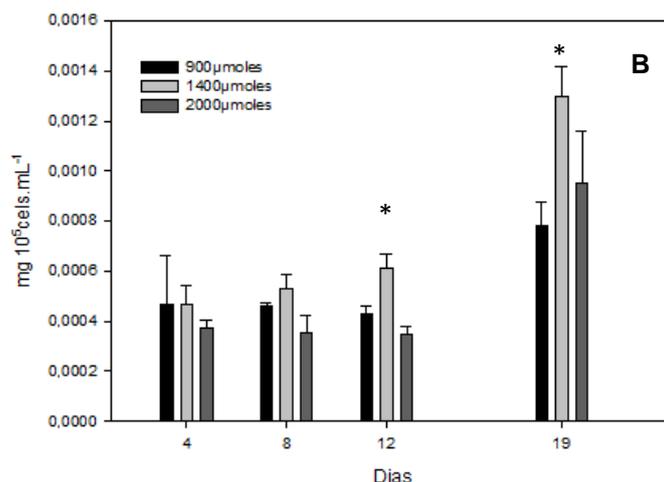


Figura 14: Variação da massa bruta total de éteres metílicos de ácidos graxos (FAME), resultantes da derivatização dos extrato bruto lipídicos em mg.L<sup>-1</sup> (A) e mg.10<sup>5</sup> céls<sup>-1</sup> (B) produzidos por *Ankistrodesmus* sp. nos cultivos em 900, 1400 e 2000 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Diferença significativa: \*(p<0,05).

A variação do conteúdo de ésteres de ácidos graxos totais foi avaliada em função do tempo de cultivo e entre as diferentes intensidades luminosas. Foi verificado um aumento progressivo ao longo de cada cultivo. Por outro lado, não houve diferença entre as intensidades luminosas testadas até o 12º dia. Apenas no 19º dia foi verificada uma diferença significativa (p<0,05) no conteúdo total de ésteres entre as intensidades luminosas, onde a produção na intensidade luminosa de 1400 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> foi 26% maior do que na intensidade de 900 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e 37% maior do que os cultivos em 2000 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Os resultados expressos por 10<sup>5</sup> céls.mL<sup>-1</sup> apresentaram para a condição de 900 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> uma mesma tendência exponencial observada nos resultados expressos em mg.L<sup>-1</sup>, com diferença significativa para o tratamento em 900 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> a partir do 12º dia de cultivo em relação aos demais tratamentos (p<0,05). Os cultivos realizados na intensidade luminosa de 900 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> apresentaram a segunda melhor produção exceto no 19º dia onde a condição de 2000 μmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> apresentou o segundo melhor rendimento de ésteres totais.

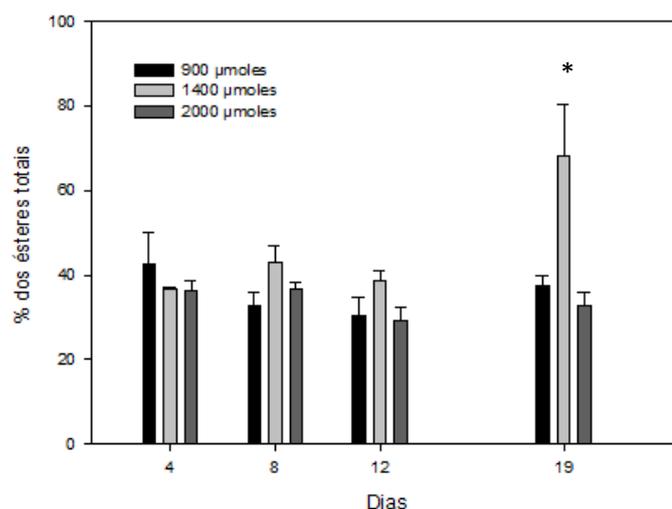


Figura 15: Relação percentual do total de ésteres de ácidos graxos no extrato bruto lipídico produzido por *Ankistrodesmus* sp. nas intensidades luminosas testadas. Diferença significativa: \*( $p < 0,05$ ).

A figura 15 mostra em termos percentuais a relação entre os ésteres totais e a massa de extrato bruto lipídico produzida nas condições testadas. Não foram observadas variações significativas para os tratamentos em 900 e 2000  $\mu\text{moles}$   $\text{fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  pois estas relações permaneceram constantes. Os cultivos iniciados em 1400  $\mu\text{moles}$   $\text{fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  apresentaram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no 19º dia.

Tabela VII: Variação da produtividade da biomassa seca durante a fase exponencial de crescimento, produtividade lipídica (extrato bruto lipídico) e produtividade dos ésteres totais durante a fase estacionária de crescimento, em função da intensidade luminosa testada. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Intensidade luminosa $\mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Produtividade da biomassa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Produtividade Lipídica ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Produtividade dos ésteres ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )
------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

900	0,15 ( $\pm 0,002$ )	21,1 ( $\pm 1,2$ )	7,9 ( $\pm 0,8$ )
1400	0,18 ( $\pm 0,0008$ )	15,3 ( $\pm 3,0$ )	10,2 ( $\pm 1,1$ )
2000	0,13 ( $\pm 0,0005$ )	18,0 ( $\pm 2,7$ )	5,7 ( $\pm 0,2$ )*

---

A maior produtividade lipídica foi verificada na intensidade em 900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , demonstrando que houve uma tend\ecencia dos melhores resultados de produ\cção de extrato bruto lipídico nessa condi\cção, no entanto, em termos de \csteres de \ccidos graxos, a maior produtividade ocorreu na intensidade luminosa de 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  seguida pelo tratamento em 900  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e o tratamento em 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  respectivamente. Foi observado que no extrato bruto lipídico havia uma gama de compostos lipofílicos, al\em dos \csteres de interesse, que poderiam induzir uma superestima\cção da produtividade lipídica. Dessa forma, seria mais adequado comparar a produtividade da microalga em cada intensidade luminosas em termos de \csteres totais. No entanto, os resultados encontrados na literatura reportados para outros g\ecneros de microalgas n\ao deixam claro se o c\cculo desta produtividade foi baseado no extrato lipídico bruto ou no conte\udo de \csteres produzidos. Por isso, a produtividade do extrato bruto lipídico foi utilizada para a compara\cção com resultados obtidos por outras linhagens de microalgas.

Para a clorofíceia *Nannochloropsis oculata* cultivadas em 500  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  foram reportados valores de 0.32  $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de produtividade lipídica (Su *et al.*, 2010). Para uma linhagem de *Scenedesmus obliquus* foi reportada produtividade de 7.14 e 15.9  $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Mandal & Mallick, 2009). *Chlorella vulgaris* alcan\cçou valores entre 16 e 40  $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  em cultivos sob irradi\ancia de 60 e 120  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Jian-Ming *et al.*, 2010).

Em estudo utilizando linhagens isoladas de ambientes marinhos brasileiros, foram reportadas produtividades lipídicas de 14,9 e 19,3 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para *Nannochloropsis oculata* e *Phaedodactylum tricornutum*, respectivamente (Soares, 2010).

Tabela VIII: Massa dos ésteres de ácido graxo ( $\text{ng} \cdot 10^5 \text{cél. mL}^{-1}$ ) resultantes da metilação do extrato bruto lipídico de cada réplica do cultivo iniciado na intensidade luminosa de  $900 \mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

		900 $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$											
Ácido graxo	Nome comum	Dia 4			Dia 8			Dia 12			Dia 19		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
C11:0	Ácido Undecaenóico	n.d.	n.d.	0,007	a.p.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C12:0	Ácido Dodecaenóico	0,09	n.d.	0,008	a.p.	0,005	0,002	0,9	n.d.	0,7	n.d.	n.d.	n.d.
C16:0	Ácido Palmítico	30,6	51,6	34,7	a.p.	6,9	27,4	85,2	65	52,1	20,6	n.d.	91,8
C17:0	Metil-heptadecanoato	0,02	n.d.	n.d.	a.p.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.	0,006	n.d.	n.d.	0,7

---

C18:0	Ácido Estearico	5	8,4	6,1	a.p.	0,8	3,5	8,5	5,5	4,2	2,9	n.d.	13,5
C18:1n-9	Ácido Oléico	3,35	4,6	5,2	a.p.	2,7	17,1	5,5	9,2	3,5	33,4	2,8	150,2
C18:2n-6	Ácido Linoléico	n.d.	n.d.	59	a.p.	14,6	15,1	2,0	4,6	0,3	15,1	n.d.	72,6
C20:1	Ácido Cis-eicosaenóico	0,12	n.d.	n.d.	a.p.	0,004	0,4	0,003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,6

---

(n.d) corresponde aos ésteres não detectados na amostra, e (a.p.) amostras perdidas

Tabela IX: Massa dos ésteres de ácido graxo ( $\text{ng} \cdot 10^5 \text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) resultantes da metilação do extrato bruto lipídico de cada réplica do cultivo iniciado na intensidade luminosa de  $1400 \mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

---

1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Ácido graxo	Nome comum	Dia 4			Dia8			Dia 12			Dia 19		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
C11:0	Ácido Undecaenóico	16,1	0,12	n.d.	1,6	a.p.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	n.d.	n.d.	n.d.
C12:0	Ácido Dodecaenóico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	a.p.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C16:0	Ácido Palmítico	109,2	57,2	105,2	17,3	a.p.	41,1	133,5	55,1	68,4	0,1	35,4	105,5
C17:0	Metil-heptadecanoato	0,4	n.d.	n.d.	0,02	a.p.	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	0,001	n.d.	n.d.
C18:0	Ácido Esteárico	0,08	7,7	17,1	0,006	a.p.	4,8	15	5,1	5	0,01	6,1	17,7
C18:1n-9	Ácido Oléico	19,3	10,2	2,9	9,5	a.p.	19,6	65,7	52,1	44	0,2	44,3	165,3

C18:2n-6	Ácido Linoléico	71,3	140,5	97,4	4,5	a.p.	8,9	86	25,3	23,6	0,09	11,9	65,7
C20:1	Ácido Cis-eicosaenóico	0,6	n.d.	n.d.	0,007	a.p.	0,2	0,85	0,7	n.d.	0,002	0,8	2,3

(n.d) corresponde aos ésteres não detectados na amostra, e (a.p.) amostras perdidas

Tabela X: Concentração dos ésteres de ácidos graxos ( $\text{ng} \cdot 10^5 \text{cél. mL}^{-1}$ ) resultantes da metilação do extrato bruto lipídico de cada réplica do cultivo iniciado na intensidade luminosa de  $2000 \mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

2000 $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$													
Ácido graxo	Nome comum	Dia 4			Dia 8			Dia 12			Dia 19		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
C11:0	Ácido Undecaenóico	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	0,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

---

C12:0	Ácido Dodecaenóico	n.d.	n.d.	0,07	n.d.	1,2	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C16:0	Ácido Palmítico	37909,9	65,1	55,2	42,5	23,3	21,2	16,8	22,1	8,1	139	62,2	0,21
C17:0	Metil-heptadecanoato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C18:0	Ácido Esteárico	5558,5	18,8	200,3	5,5	4,6	1,71	1,5	1,3	n.d.	29,8	9,64	0,04
C18:1n-9	Ácido Oléico	3689,1	6,6	3,1	25	21,4	7	3,7	0,01	0,78	254,5	22	0,40
C18:2n-6	Ácido Linoléico	42315,3	95,1	82,3	17,8	23	5,2	13,9	n.d.	14,7	140	2,9	0,16
C20:1	Ácido Cis-eicosaenóico	n.d.	n.d.	n.d.	0,36	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

---

(n.d) corresponde aos ésteres não detectados na amostra

As tabelas VIII, IX e X mostram as concentrações de 8 ésteres de ácidos graxos interessantes para a produção de biodiesel, produzidos pela linhagem ANFR-01. Foi possível detectar sete entre oito ácidos graxos estudados. A exceção ocorreu para o ácido dodecanóico (C12:0) no tratamento em 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ .

Os resultados gravimétricos do extrato bruto lipídico e dos ésteres de ácido graxos totais indicam que não houve grande diferença da recuperação na extração dos lipídeos contidos na biomassa, já que foi verificada uma homogeneidade dos resultados entre as réplicas. O mesmo foi verificado nos resultados de ésteres totais resultantes da esterificação do extrato bruto lipídico. No entanto, a metodologia utilizada para metilação dos ésteres de ácidos graxos, adaptada de Joseph & Ackman (1992), foi inicialmente desenvolvida para 25mg de ácido graxo. Com isso, os reagentes e as soluções empregadas na matriz estudada foram adequados de forma proporcional a quantidade de material obtido nos cultivos. Acredita-se que esta redução nos volumes dos reagentes pode ter afetado tanto a eficiência quanto também a reprodutibilidade da metilação realizada, uma vez que foram observadas variações nos resultados das concentrações dos ácidos graxos entre as réplicas, não sendo possível fazer explicações conclusivas sobre a concentração de cada éster produzido nas diferentes condições testadas, considerando os resultados obtidos nas triplicatas analíticas.

Além de promover modificações nos pigmentos celulares, nas características fotossintéticas e na morfologia das microalgas o aumento da intensidade luminosa parece também exercer efeitos na produção dos lipídeos pelas microalgas. Estes resultados estão em consonância com os resultados obtidos por Myamoto (1997) em cultivos de *Euglena gracillis* e *Chlorella vulgaris*, onde o aumento da intensidade luminosa resultou em um maior acúmulo de ácidos graxos. Na mesma linha, Carvalho & Malcata (2005) verificaram um aumento na produção de ácidos graxos combinando altas intensidades de luz e concentração de CO<sub>2</sub>. Sánchez-Saavedra & Voltolina (2005) relatam um aumento de 65% na concentração de lipídeos na fase estacionária

do crescimento da diatomácea *Chaetoceros* sp., mantida sob iluminação de 125  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ .

Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com o que a literatura apresenta como regra geral. Foi verificado que o aumento da intensidade luminosa favoreceu o aumento do acúmulo de ácidos graxos. Este efeito foi mais expressivo na irradiância de 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ , condição intermediária entre as três intensidades testadas, principalmente nas primeiras fases do cultivo.

Williams & McMillan, (1961) estudando os lipídeos produzidos por uma linhagem de *Ankistrodesmus braunii*, verificaram que, em relação à biomassa celular, o percentual lipídico máximo alcançado em estado estacionário pelas culturas crescidas em 400 até 500 ft-ca (equivalentes à 50 e 65  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ , respectivamente) foi de 18,6% na quarta semana e 33,7% na sétima semana de cultivo. A caracterização por cromatografia gasosa, segundo estes autores, apontou os ácidos linoléico, oléico e palmítico, como os principais ésteres de ácidos graxos produzidos pela microalga. Estes resultados não puderam ser comparados em termos quantitativos com os resultados obtidos pela linhagem utilizada neste estudo, no entanto os resultados do presente estudo demonstraram a presença de ácido esteárico no conjunto dos ésteres identificados.

Ainda que a relação entre produção dos ésteres metílicos de ácidos graxos e as fases do cultivo tenha sido maior na fase estacionária (19º dia de cultivo), a análise qualitativa destes ésteres mostrou que, independente da intensidade luminosa aplicada, o maior rendimento dos ésteres metílicos de interesse ocorreu na fase estacionária do crescimento (4º dia de cultivo). Entre as irradiâncias testadas foi observada uma melhor relação dos ésteres produzidos nos cultivos em 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ .

Em consideração à finalidade deste estudo, os resultados apresentados, indicam que altas intensidades luminosas para a linhagem estudada, além de

promoverem um aumento do conteúdo lipídico, também promoveram à otimização do tempo de cultivo. Estes resultados são bastante promissores uma vez que os cultivos em larga escala visam grandes produções em um curto tempo.

## 5- Conclusões

- O aumento das intensidades luminosas aos níveis testados não promoveu diferenças na taxa de crescimento celular, na razão máxima de crescimento e na duração da fase exponencial. Esta resposta sugere que a linhagem testada é adequada para cultivos em sistemas abertos.

- O conteúdo de carboidratos intracelulares foi maior nas intensidades luminosas mais altas e o conteúdo excretado foi maior na intensidade luminosa mais baixa, ainda que em ambos os casos o aumento da síntese e excreção tenha ocorrido na fase estacionária do crescimento.

- O aumento da intensidade luminosa promoveu modificações no teor de alguns ésteres de ácidos graxos. Essa diferença foi mais evidente no tratamento em 2000  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ .

- Quando comparados os resultados de produtividade dos ésteres, ficou claro que para a linhagem de *Ankistrodesmus* testada o melhor desempenho ocorreu nos cultivos iniciados em 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ .

- Também pode-se assumir que os cultivos submetidos à irradiância de 1400  $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$  apresentaram os melhores rendimentos em termos de biomassa celular e ésteres totais.

- A adaptação da metodologia de metilação para a quantificação dos ésteres de ácidos graxos demonstrou não ser reprodutiva, indicando a necessidade de buscar métodos novos e mais adequados às quantidades alcançadas nos cultivos de microalgas em escalas laboratoriais.

-Os ésteres de ácidos graxos verificados compreenderam apenas uma fração do total de ésteres obtidos a partir da esterificação do extrato bruto lipídico.

- A presença dos ésteres de ácidos graxos verificados no extrato bruto lipídico comprovam que *Ankistrodesmus* sp. é uma linhagem produtora de lipídeos interessantes para a produção de biodiesel.

## **6- Perspectivas**

- Caracterizar e quantificar macromoléculas de interesse biotecnológico restantes na biomassa após o processo de extração dos lipídeos e propor um destino a este material.

- Caracterizar os demais ésteres de ácidos graxos produzidos pela microalga e estudar sobre potenciais aplicações biotecnológicas destes ésteres.

## 7- Referências bibliográficas:

ABED, R.M.M., DOBRETSOV, S. & SUDESH, K. 2008. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. **106**: 1-12.

ANDERSEN, R. A. 2005. *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press, USA. 578p.

ANDERSON, J.M.; PARK, Y.I. & CHOW, W.S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum*, **100**: 214-223.

AUGUSTÍ, S.; ENRÍQUEZ, S.; FROST-CHRISTENSEN, H.; SAND-JENSEN, K. & DUARTE, C.M. 1994. Light harvesting among photosynthetic organisms. *Functional Ecology*. **8**:273-279.

BECKER, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. Handbook of microalgal culture, Richmond A. Ed. Blackwell, Oxford. 312-351.

BENEMANN, J.R. & OSWALD, W.J. 1996. Systems and economic analyses of microalgae ponds for conversion of CO<sub>2</sub> to biomass: Final report to the Department of Energy. Pittsburg Energy Technology Center, 201p.

BJÖRKMAN, O. 1981. Response to different quantum flux densities. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. p.57.

BOROWITZKA, M.A. & BOROWITZKA, L.J., 1988. *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University, 477p.

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

CARVALHO, A. P. & MALCATA, F. X. 2005. Optimization of omega-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology* **7**(4): 381-388.

CHISTI, Y., 2007. Biodiesel from microalgal. *Biotechnology Advances* **25**: 294–306.

CONGMING, L.; KRISHNA, R.; HALL, D. & VONSHAK, A. 2001. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) in *Monodus subterraneus* grown in a helical tubular photobiorreactor as affected by cell density and light intensity. *Journal of Applied Phycology* **13**: 517-522.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. & RAMOS, L. P. 2000. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da

transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*. **23**: 531-537.

DARLEY. M.W. 1988. *Algal Biology: a physiological approach*. Blackwell Scientific, Oxford, London.

DERNER, R. B., OHSE, S., VILELA, M., CARVALHO, S. M. e FETT, R., 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* **36** (6): 1959-1967.

DRING, M.J. 1990. Light harvesting and pigment composition in marine phytoplankton and macroalgae. In: Herring, P.J., Campbell, A.K., Whitfield, M. & Maddock, L. *Light and life in the water*. Cambridge University Press, Cambridge. 89-103.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J.K., REBERS, P. A., & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**(3):350-356.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S. & SCABINO, A. 2005. Estabilidade oxidativa dos esters de ácido graxo do biodiesel de óleo de soja. *Ciência Agrícola*. **62**:291-295

FINKEL, Z.V.; BEARDALL J.; FLYNN, K.J.; QUIGG, A. REES, T.A. & RAVEN, J.A. 2010. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research* **32**:119-137.

FOGG, G.E. and B. THAKE. 1987. Algae cultures and phytoplankton ecology, 3<sup>rd</sup> edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London.

FOLCH, J.; LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 497-509.

GORHAN, P., JR. MACLACHLAV, V.T. HAMMER, & W.K.KIM. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de bréb. *Verh. Intern. Ver. Fur Theor. Ang. Limnol.* **15**:796-804.

GREENSPAN, J.S., GADOL, N., HOOVER, C.I., JACOBSEN, P.L., SHILLITOE, E.J., & A RMITAGE, G.C. 1985. Lymphocyte function in recurrent aphthous ulceration. *Journal of the European Academy and Dermatology and Venerology*, London, **14**(8): 592-602.

GROBBELAAR, J.U. & KURANO, N. 2003. Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *J. App. Phycol.* **15**:121-126.

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M.K. & WEBLEY, P.A. 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* **102**: 178-185.

[HARTMAN, L.](#) & LAGO, R. C. A. 1973. Further observations concerning effects of unsaponifiable constituents on the properties of coffee seed oil . *Journal of the American Oil Chemists Society Champaign*. **50**(1): 99-100.

HIRAI, A., ISHIBASHTI, T., MORIKAMI, A., IWATSUKI, N., SHINOZAKI, K & SUGIURA, M. 1985. Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large subunit of ribulose, 1,5-biphosphate carboxylase and the 32KD potosystem II reaction center protein. *Theor. Appl. Genet.* **70**: 117-122.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JAVS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SLIBERT, M. & DARZINS, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant. J.* **54**:601-639.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. ZHANG, X. & CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy.* **87**(1): 38-46.

HUERLIMANN, R; NYS, R. & HEIMANN, K. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering* **107**:245-257.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A., NAGAI, S. & YOSHIMURA, M. 2000. A highly CO<sub>2</sub>-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1 enriched from coastal sea and its fatty acid composition. *Fish. Sci.* **66**: 655-659.

JIAN-MING, LV.; CHENG, L.H.; XU, X.H.; ZHANG, L. & CHEN, H.L. 2010. Enhanced lipid productions of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. **101**: 6797-6804.

JOSEPH, J.D. & ACKMAN, R.G. 1992. Capillary column gas chromatography method for analyses of encapsulated fish oil and fish oil methyl esters: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. **75**:488-506.

JEFFREY, S.M. & HUMPHEY, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. **167**:191-194.

LEPAGE, G. & ROY, C.C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res*. **25**:1391-1396.

LEY, A.C. & BUTLER, W.L. 1980. Effects of chromatic adaptation on the photochemical apparatus of photosynthesis in *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiology*. **65**: 714-722.

LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y & CHEN, F. 2010. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*. **102**:106-110.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S. & FALKOWSKI, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **45**: 633-662.

LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 343-346.

MANDAL, S. & MALLICK. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production by Mandal, S. and Mallick, N. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**: 281-291.

MANSOUR, M.P.; FRAMPTON, D.M.F.; NICHOLS, P.D. VOLKMAN, J.K. 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: applications and unusual C<sub>24</sub>-C<sub>28</sub> polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phcology* **17**: 287-300.

McKIM, S.M. & DURNFORD, D.G. 2006. Translational regulation of light-harvesting complex expression during photo acclimation to high-light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **44**: 857-865.

MOLICA, R.J.R. 1996. Contribuição ao conhecimento da ecologia, toxicologia e filogenia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cianobactéria). Tese de Doutorado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MIYAMOTO, K. 1997. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production (FAO Agricultural Services Bulletin - 128). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

MYKLESTAD, S. & HAUG, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willwi* (gran) Husted. I – Effect of the concentration nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **9**:125-136.

MOLINA G. E., BELARBI E-H., ACIÉN F. F. G., ROBLES M. A. & CHISTI Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* **20**:491-515,

MURADYAN, E. A.; KLYACHKO-GURVICH, G. L.; TSOGLIN, L. N.; SERGEYENKO, T. V. & PRONINA, N. A. 2004. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO<sub>2</sub> Concentration. *Russ. J. Plant Physiol.* **51**: 53-62.

PADISÁK, J. 2003. Phytoplankton. In: O'SULLIVAN, P. E.; REYNOLDS, C. S. (eds) The Lakes Handbook 1. Limnology and Limnetic Ecology. Oxford: Blackwell Science. pp. 251-308.

PARSONS, T. R.; MAITA, Y. & LALLI, C. M. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 p.

PASSARGE, J.; HOL. S.; ESCHER, M. & HUISMAN, J. 2006. Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states, or competitive exclusion? *Ecological Monographs*, **76** (1) 57-72.

PINTO, R.; FERREIRA, A. S. & ALBINO, L.F.T. 2002. Níveis de proteína e energia para codornas japonesas em postura. *Revista Brasileira de Zootecnia*. **31**(4): 1761-1770.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H. & POHL, P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, **23** (2): 207-216.

PLAZA, M., HERRERO, M., CIFUENTES, A. & IBÁÑEZ, E. 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 7159-7170.

PULZ, O. & GROSS, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **65** (6): 635-648.

RADMANN, M.E. & COSTA, J.A.U. 2008. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. *Química Nova*, **31** (7): 1609-1612.

RICHARDSON, D.L.; REED, R.H. & STEWART, W.D.P. 1983. *Synechocystis* PCC6803: a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiology Letters*. **18**:99-102.

RICHMOND, A. (Ed), 1988. CRC Handbook of microalgal mass culture. Florida: CRC. 528p.

ROGERS, L.J. & GALLON, J.R. 1988. Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe). Oxford University. 392p.

ROUND, F.E. 1973. Biology of the Algae. Publishers Ltd. London. 263p.

SÁNCHEZ-SAAVEDRA. M. P & VOLTOLINA, D., 2005. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacultural engineering* **35**: 161–165.

SÁNCHEZ M. A., CONTRERAS G. A., GARCÍA C. F., MOLINA G. E. & CHISTI Y. 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J Biotechnol.* **70**: 249-270.

SCHENK, P. M, THOMAS-HALL, S. S. R., STEPHENS, E., MARX, U. C, MUSSGNUG, J. H., POSTEN, C., KRUSE, O. & HANKAMER, B., 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy. Res.* **1**:20–43.

SHIMIZU, Y., 1996. Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 431-465.

SILVA, A. F. ; Lourenço, S. O. & Chaloub, R. M. 2009. Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Aquatic Botany.* **91**: 291-297.

SINGH, A.; NIGAM, P.S. & MURPHY, J.D. 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology* **102**: 10-16.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. & FIORESI, T.B. 2008. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. *Biotemas* **21**(1):7-16.

SOARES, D. 2010. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. Dissertação de mestrado. Univeridade Federal do Paraná. 107p.

SOLOVCHENKO, A. E. & GOLDBERG, I. K. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J. Appl. Phycol.* **20**:245-251.

SOROKIN, C. & KRAUSS, R.W. 1958. The effects of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant Physiol.* **33**(2):109-113.

STUART, A. S.; DAVEY M. P; DENNIS, J.S.; HORST, IM. HOWE, C.J.; LEA-SMITH, D.J & SMITH, A.G. 2011. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* **21**:277-286.

SU, C.H; CHIEN, L.J.; GOMES, J; LIN, Y.S.; YU, Y.K.; LIOU, J.S.; SYU, R.J. 2010. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.*

SUKENIK, A.; CARMELI, Y. & BERNER, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmaphyte *Nannochloropsis sp.* *J. Phycol.* **25**: 686-692.

TEIXEIRA, V.L. 2002. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA,R.G.; SOARES-GOMES, A. *Biologia marinha*. Rio de Janeiro: Interciência, 249-279.

TEIXEIRA, C.M.L.L. & MORALES, E. 2006. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. *Anais do 1º Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel*. 91-96.

THINH, L. V. 1983. Effect of irradiance on the physiology and ultrastructure of the marine *Cryptomonas* strain Lis (Cryptophyceae). *Phycologia*. **22**: 7-11.

VIEIRA, A. A. H. & CÁCERES, O. 1987. Excreção de carboidratos solúveis por microalgas de água doce. I. Comparação de nove diferentes espécies em quatro meios de cultura. *Ciência e cultura* **39(11)**:1070-1074.

VIEIRA, A. A. H. & MYKLESTAD, S. 1986. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). *Journal of Plankton Research*. **8**: 985-994.

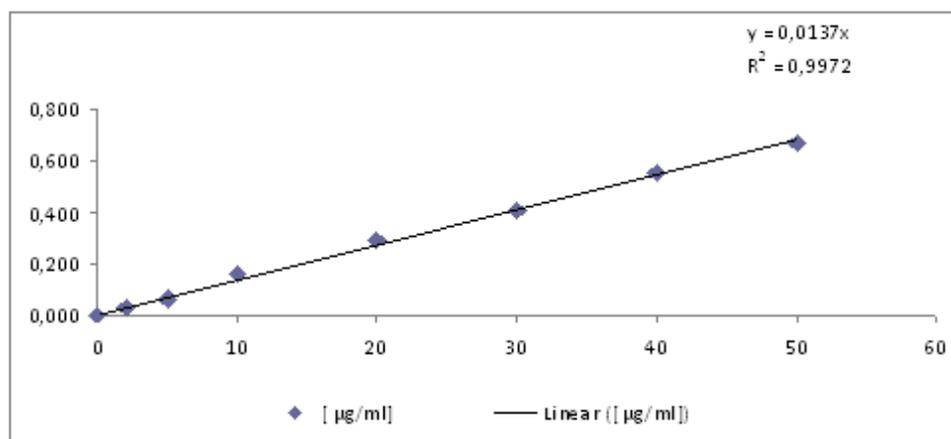
WILLIAMS, V. R. & McMILLAN. 1961. Lipids of *Ankistrodesmus braunii*. *Science*. **133**: 459-460.

WU, J.; NEIMANIS, S. & HEBER, U. 1991. Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Acta Botanica*. **104**: 283-291.

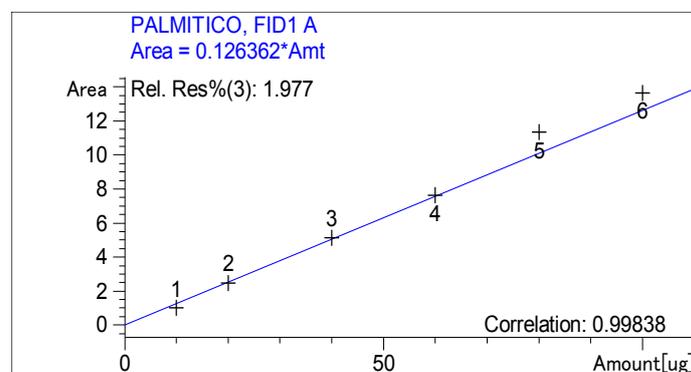
ZEMKE, P. E. WOOD, B. D. & DYE, D. J. 2010. Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass and Bioenergy*. **34**:145-151.

## Anexos

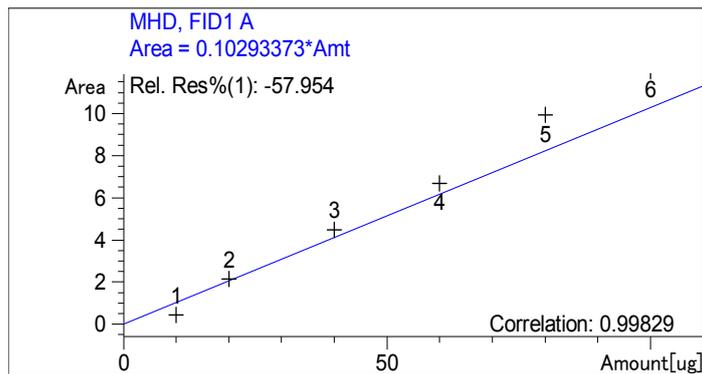
Anexo A: Curva padrão glicose para quantificação de carboidratos intracelulares e extracelulares



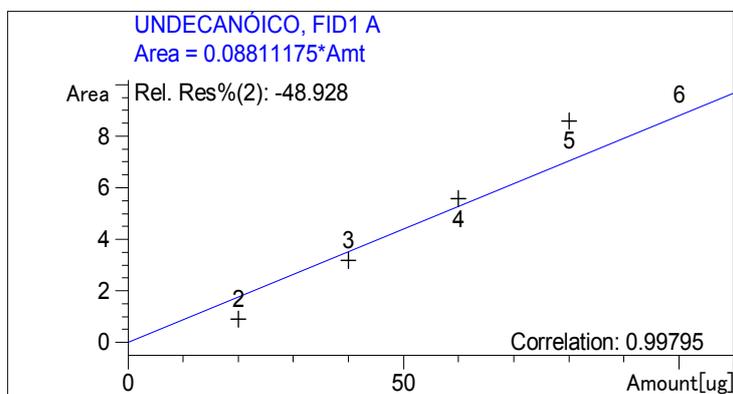
Anexo B: Curva padrão ácido palmítico



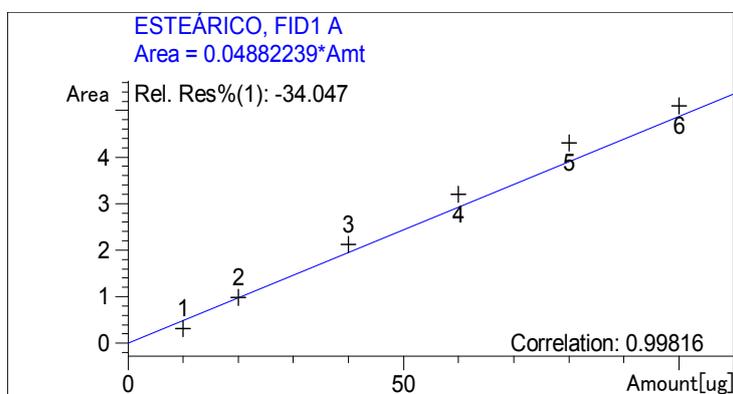
Anexo C: Curva padrão metil heptadecanoato



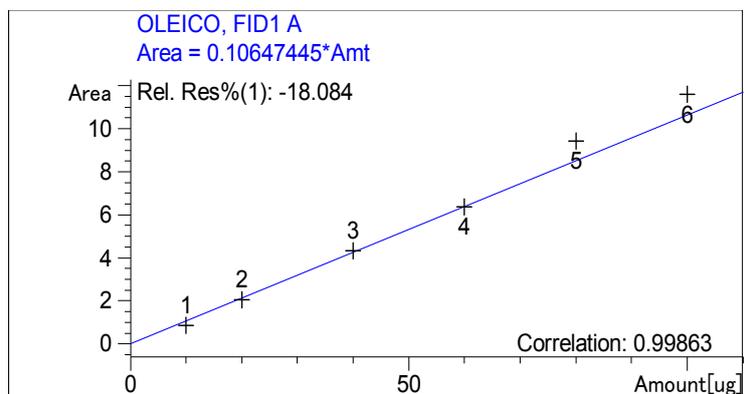
#### Anexo D: Curva padrão ácido undecaenóico



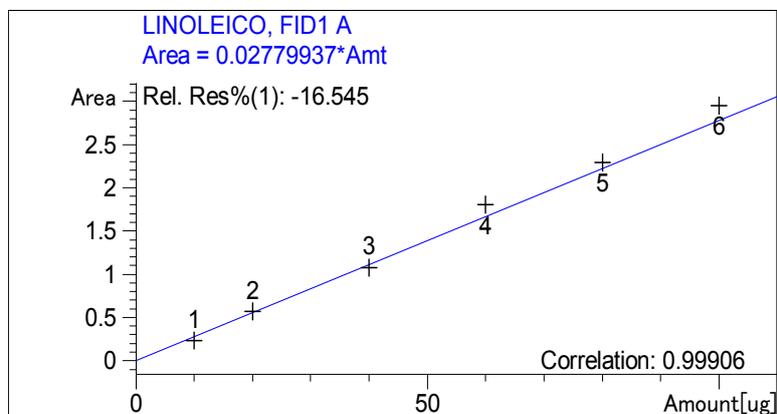
#### Anexo E: Curva padrão ácido esteárico



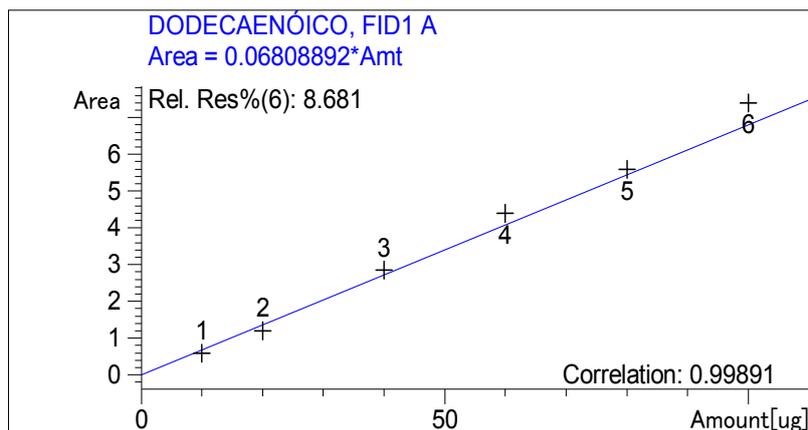
## Anexo F: Curva padrão ácido oléico



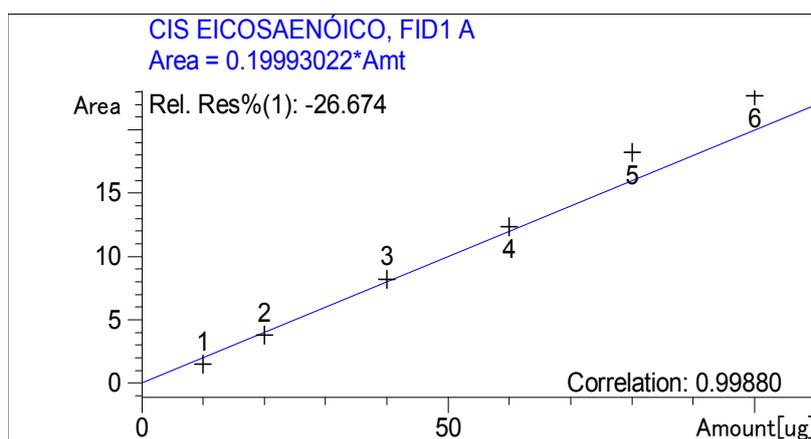
## Anexo G: Curva padrão ácido linoléico



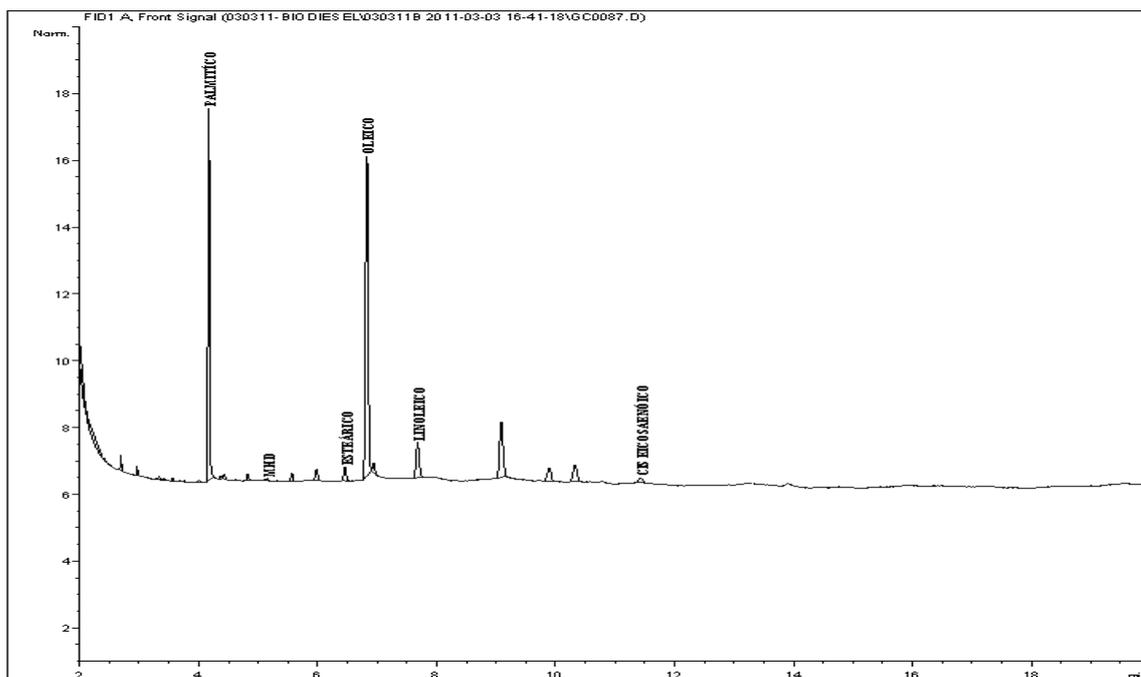
## Anexo H: Curva padrão ácido dodecaenóico



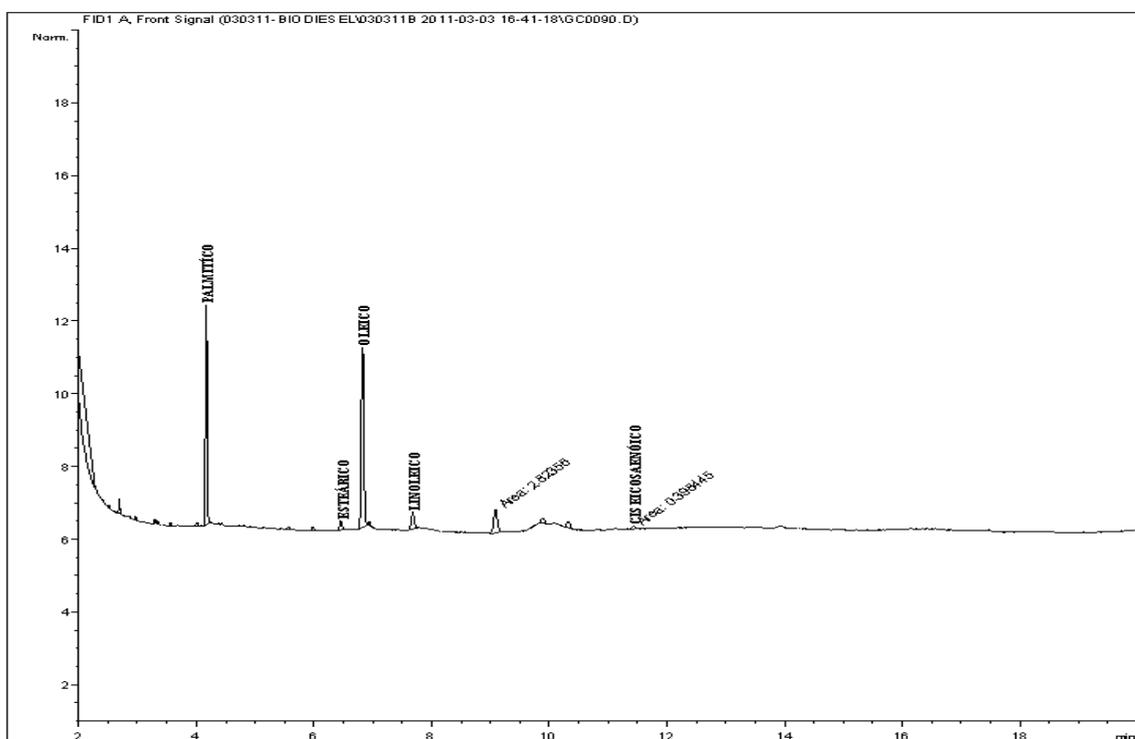
Anexo I: Curva padrão ácido cis-eicosaenóico



Anexo J: Cromatograma do perfil lipídico apresentado pela microalga *Ankistrodesmus* sp. no 19º dia de cultivo iniciado em  $900 \mu\text{moles f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



Anexo L: Cromatograma do perfil lipídico apresentado pela microalga *Ankistrodesmus* sp. no 19º dia de cultivo iniciado em  $1400 \mu\text{molos f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$



Anexo M: Cromatograma do perfil lipídico apresentado pela microalga *Ankistrodesmus* sp. no 19º dia de cultivo iniciado em  $2000 \mu\text{moles f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

