

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

LAIS BESSA DOS SANTOS

**EFEITOS DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO
NO CRESCIMENTO E SÍNTESE LIPÍDICA POR *Ankistrodesmus*
*sp.***

RIO DE JANEIRO
2011

LAIS BESSA DOS SANTOS

EFEITOS DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO NO
CRESCIMENTO E SÍNTESE LIPÍDICA POR *Ankistrodesmus sp.*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Sandra Maria F. O. e Azevedo

RIO DE JANEIRO
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Lais Bessa dos S..

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2011.

x, 73f.

Orientador: Sandra Maria F. O. e Azevedo

1. Microalgas. 2. Lipídeos. 3. Biodiesel – Dissertações. I. Azevedo, Sandra Maria F. O. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Pós-Graduação em Biofísica. III. Efeitos da variação da concentração de fósforo no crescimento e síntese lipídica por *Ankistrodesmus sp.*

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAIS BESSA DOS SANTOS

Efeitos da variação da concentração de fósforo no crescimento e síntese
lipídica por *Ankistrodesmus sp.*

Programa de Pós-Graduação em Biofísica (Ciências Biológicas)

Rio de Janeiro,..... de de 20...

Sandra Maria F. de O. e Azevedo
Ph.D – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
UFRJ

Christianne Bandeira de Melo
Ph.D – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
UFRJ

Mariângela Menezes
Ph.D – Departamento de Botânica
UFRJ

Fernanda Reinert Thomé Macrae
Ph.D – Programa de Biotecnologia Vegetal
UFRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais
queridos, irmã amada e
meu marido apaixonado,
João Leitão.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Biofísica Ambiental do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Biofísica.

À Petrobras, COPPETEC, pelo apoio financeiro.

À Professora e amiga Sandra Maria F. O. e Azevedo pela orientação e apoio.

Ao professor Ricardo Machado Kuster pela ajuda acadêmica para a realização desse trabalho.

Ao profissional Ari Miranda da Silva pela ajuda fundamental no desenho das metodologias empregadas.

À profissional Bárbara Prestes pela ajuda fundamental no desenvolvimento da metodologia e análise dos resultados de lipídeos.

À profissional Priscila Koschek pelo auxílio em diversas etapas dos testes realizados.

À aluna de Doutorado Isabel Rocha pela ajuda crucial na análise interpretação dos resultados obtidos nos nutrientes.

À aluna de Mestrado, na época, Carolina Miranda, pela troca de informações e ajuda no desenvolvimento de todo projeto de Mestrado.

Ao nosso Ricardinho, maravilhoso em todos os momentos em que precisamos de ajuda.

À todos os integrantes do LETC pela solidariedade, companheirismo e momentos de alegria nesses 2 anos de trabalho.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e na minha capacidade. E pelo apoio financeiro crucial, necessário para o bolsista de hoje.

À minha irmã mais que maravilhosa e orgulhosa que eu tenho.

Ao meu atual marido e eterno namorado, João Leitão.

RESUMO

As microalgas são micro-organismos promissores como matéria-prima alternativa para a produção de biodiesel. A matriz energética está em processo de mudança e fontes biodegradáveis e renováveis são objetos de muitos estudos atualmente. O estresse nutricional é uma ferramenta fisiológica comumente estudada para estimular a síntese lipídica de reserva por microalgas. O que é fundamental para o aproveitamento dessa biomassa para a produção de biodiesel. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da concentração de fósforo no crescimento e síntese de lipídeos pela microalga *Ankistrodesmus sp.* (cepa ANRF-01). Para essa finalidade, o meio ASM-1 foi manipulado em relação a sua concentração inicial de ortofosfato, de modo que, foram obtidas 3 diferentes concentrações de fósforo nos meios de cultivo da cepa estudada. Os tratamentos nomeados de controle, P10 e P50 iniciaram o experimento com valores de 227 μM , 22,7 μM e 4,54 μM de PO_4^{-3} , respectivamente. Os cultivos foram desenvolvidos por 20 dias a 24°C, com aeração constante, intensidade luminosa de 500 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h, pH inicial 8,0 e 6 L de volume de cultura. Foram realizadas análises do crescimento celular, variação da concentração de clorofila-a, carboidratos e nutrientes (nitrato e fosfato). Os lipídeos foram analisados em relação ao percentual de extrato bruto e suas classes de ácidos graxos. Nos resultados foi observado maior número de células e biomassa para a condição controle. A condição com maior limitação nutricional (P50) apresentou menor quantidade de biomassa, porém as condições P10 e P50 apresentaram valores próximos de biomassa para o 9º dia de cultivo (224 e 216 mg/L, respectivamente). Os maiores valores de lipídeos produzidos foram detectados no tratamento P50. Entre os dias amostrados para análise de lipídeos, o 9º dia de cultivo foi o mais promissor para o conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos de interesse. Há a necessidade de quantidade significativa de biomassa, alto conteúdo de lipídeos e um perfil de ácidos graxos de interesse para a produção economicamente viável de biodiesel, a partir de microalgas. Logo, o estudo indica que, a condição P50 no 9º dia (fase estacionária) seria a mais adequada como fonte alternativa, em uma futura produção de biodiesel em larga escala. Estudos posteriores devem ser realizados para um melhor embasamento fisiológico sobre as condições de cultivos desses organismos, com este objetivo biotecnológico.

Palavras chave: microalga, lipídeos, concentração de fósforo e biodiesel.

ABSTRACT

Microalgae are micro-organisms promising as an alternative raw material for biodiesel production. The energy matrix is in process of change and biodegradable and renewable sources are objects of many studies nowadays. The nutritional stress is a commonly studied physiological tool to stimulate the synthesis of lipid reserves by microalgae. What is fundamental to the use of microalgae biomass for the biodiesel production. The objective of this study was to evaluate the effects of phosphorus concentration on growth and lipid synthesis by the microalgae *Ankistrodesmus* sp. (strain ANRF-01). For this purpose, the ASM-1 medium was manipulated relative to its initial concentration of orthophosphate. So, we obtained three different concentrations of phosphorus in the culture medium of the strain studied. Treatments appointed control, P10 and P50 started the experiment with values of 227 μM , 22.7 μM and 4.54 μM PO_4^{-3} , respectively. The cultures were developed for 20 days at 24°C with constant aeration, light intensity of 500 $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, photoperiod of 12 h, initial pH 8.0 and 6 L volume of culture. Analysis were developed for cell growth, varying the concentration of chlorophyll a, carbohydrates and nutrients (nitrate and phosphate). The lipids were analyzed in relation to the percentage of crude extract and its classes of fatty acids. In the results we observed more cells and biomass for the control condition. The condition with the highest nutritional limitation (P50) showed a lower amount of biomass, but the conditions P10 and P50 showed biomass values close to the 9th day of culture (224 and 216 mg / L, respectively). The highest values of lipids produced were detected in the P50 treatment. Among the days sampled for analysis of lipids, the 9th day of culture was the most promising for the lipid content and fatty acid profile of interest. There is need for significant amount of biomass, a high content of lipids and fatty acid profile of interest to the economical production of biodiesel from microalgae. Thus, the study indicates that the condition P50 on the 9th day (stationary phase) would be more appropriate as an alternative source, in a future production of biodiesel on a large scale. Further studies should be conducted to give a better basis on the physiological conditions of cultivation of these organisms for the biotechnology purpose.

Key words: microalgae, lipids, phosphorus concentration and biodiesel.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Microalgas	1
1.2	Condições Nutricionais	3
1.2.1	Meios de Cultivo	6
1.2.2	Condições de Estresse	6
1.2.3	Fósforo	8
1.3	Lipídeos de Microalgas	10
1.4	Chlorophyceae	14
1.4.1	Lipídeos para a Produção de Biocombustíveis	15
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral:	20
2.2	Objetivos Específicos:	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	Seleção da cepa para o estudo com variação nutricional	21
3.2	Micro-organismo estudado com variação nutricional e sua manutenção:	22
3.3	Preparação dos meios de cultivo	22
3.4	Condições de cultivo:	23
3.5	Amostragens para as análises fisiológicas	24
3.6	Curvas de crescimento	25
3.7	Quantificação de clorofila-a	25
3.8	Quantificação de carboidratos intracelulares e extracelulares	26
3.9	Quantificação de biomassa	27
3.10	Detecção de lipídeos intracelulares por fluorescência (“Nile Red”)	28
3.11	Lipídeos (Extrato Bruto)	29
3.12	Fluxograma das etapas realizadas para análise dos ésteres	29
3.13	Obtenção dos ésteres (“FAMES” – Fatty acid methyl ester)	30

3.14	Detecção dos “FAMEs” de interesse por Cromatografia Gasosa	30
3.15	Nutrientes:	32
3.16	Estatística	33
3.17	Fluxograma Geral	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Seleção da cepa ANRF-01	34
4.2	Estudo com variação nutricional e a cepa ANRF-01	38
4.2.1	Crescimento Celular e Biomassa	38
4.2.2	Clorofila-a	44
4.2.3	Carboidratos intra e extracelulares	48
4.2.4	Nutrientes	51
4.2.5	Lipídeos	57
4.2.6	Ésteres de ácidos graxos (“FAME’s”)	61
4.2.7	Detecção dos “FAME’s” de interesse por Cromatografia Gasosa	65
5	CONCLUSÕES	68
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microalgas

A denominação microalgas agrupa micro-organismos eucariotos e procariotos fotossintetizantes, sendo a grande maioria fitoplanctônica (REYNOLDS, 2006). As três classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae) e as algas douradas (Chrysophyceae) (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

As microalgas são um grupo ubiqüitário de micro-organismos que podem ser encontrados por todo o mundo. São principalmente distribuídas nos ambientes aquáticos, mas também podem ser encontradas na superfície terrestre em vários tipos de solos. As espécies aquáticas são encontradas praticamente em qualquer local, desde rios de água doce até lagos salgados, com tolerância para uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez e concentração de O₂ e CO₂ (TOMASELLI, 2004).

A ampla variedade morfológica, de estrutura celular, ecológica, de pigmentos fotossintetizantes, níveis de organização e produtos de reserva refletem as variadas origens evolutivas desse grupo heterogêneo de organismos que incluem procariotos (Prochlorobacterias) e eucariotos. Podemos dizer que esses seres estão entre os mais antigos do planeta e centenas de espécies fazem parte desse “universo”, constituindo a base da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos. Dessa forma, são os principais

organismos fotoautotróficos produtores de carbono orgânico nos mares e águas de interiores (REYNOLDS, 2006).

Alguns desses organismos podem viver em associação simbiótica com outras formas de vida, entretanto a maioria das microalgas é de vida livre. Em relação à organização celular, as microalgas podem ser unicelulares, coloniais e filamentosas. Os organismos unicelulares podem ou não apresentar mobilidade; nas formas móveis a capacidade de movimento deve-se, na maioria das vezes, à presença de flagelo. Entretanto, essa mobilidade das microalgas fitoplanctônicas não é capaz de vencer a turbulência das águas (REYNOLDS, 2006). A secreção de mucilagem também pode ser o responsável pela mobilidade, porém é menos frequente. As microalgas planctônicas vivem em suspensão na região luminosa dos corpos d'água, incluindo aquela abaixo do gelo em regiões polares. Podem também ser bentônicas, ligadas a substratos de fundo ou vivendo no sedimento (TOMASELLI, 2004).

Entretanto, o termo microalga não tem legitimidade taxonômica. Atualmente não existe um sistema definido de classificação das microalgas aceitável por todos. Isso ocorre, pois a taxonomia desse grupo está em constante e rápida mudança em todos os níveis genéticos e estruturais. Por isso, a distinção e classificação das microalgas de acordo com a cor e outras características ainda têm sua importância. Os sistemas atuais utilizados de classificação se baseiam em certos critérios como: funções básicas, tipos de pigmentos, produtos de reserva, constituintes da parede celular, morfologia, citologia e biologia molecular (REYNOLDS, 2006). De acordo com a classificação proposta por *Sieburth et al.* (1978), o tamanho das microalgas

varia entre 20-200 μm . Esta classificação ainda é citada em trabalhos mais atuais (REYNOLDS, 2006).

O interesse nesse grupo de organismos fototróficos deve-se ao seu potencial de utilização para a produção de biomassa para alimentação humana, ração animal e obtenção de moléculas de alto valor agregado (ex: carotenóides e ácidos graxos), usando energia solar (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988).

Um ponto positivo e atraente em relação às microalgas é o grande potencial para serem mantidas em cultivo, várias espécies são capazes de manter seu crescimento em culturas líquidas e aeradas, onde as células possuem acesso suficiente a luz, dióxido de carbono e outros nutrientes (ROSENBERG *et al.*, 2008). Em alguns casos podendo ser cultivadas em condições edafo-climáticas diversas, com a habilidade de sintetizar uma variedade de produtos metabólitos de alto valor agregado (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988).

1.2 Condições Nutricionais

O conhecimento sobre a necessidade de fornecer nutrientes minerais e outros fatores de crescimento nas culturas de algas já existe há muito tempo. As microalgas possuem diversos tipos de nutrição, onde as duas formas mais relevantes são autotrófica (fototrofia) e heterotrófica (fagotrofia). Dentre essas, a autotrófica é sem dúvida a mais importante. Nesse caso, os organismos obtêm a energia química (carboidratos e ATP) utilizando seu aparato fotossintético, onde através da conversão da energia solar em energia química,

reduzindo o CO₂ até a síntese de glicose pela oxidação de substratos, principalmente a água, com a liberação de O₂ (RENOLDS, 2006; GROBBELAAR, 2004). A maioria das microalgas pertence à categoria dos fotoautotróficos obrigatórios, ou seja, não conseguem crescer no escuro. Embora, várias espécies necessitam de quantidades ínfimas de compostos orgânicos, como vitaminas, para o seu crescimento (GROBBELAAR, 2004).

Os componentes orgânicos da célula de microalga, assim como de qualquer organismo, compreendem principalmente proteínas, lipídeos e carboidratos condensados em proporções variáveis. Na composição das microalgas, além do carbono (C) pelo menos outros 19 elementos estão presentes na composição da matéria orgânica. Alguns são necessários em concentrações na ordem de miligramas por litro (H, N, O, P, S, K, Na, Ca e Mg). Além destes, 9 elementos (Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, B e Va) podem ser detectados em sua composição como elementos traços ou micronutrientes e normalmente são requeridos em concentrações de nanogramas a microgramas por litro (REYNOLDS, 2006).

Esses micronutrientes são incorporados em moléculas orgânicas essenciais como em uma variedade de coenzimas (CoA, Cobamamida e etc) que participam de reações primordiais. Os macronutrientes formam os constituintes estruturais das biomoléculas, da membrana e do meio intracelular, e participam nos processos energéticos e de regulação das atividades metabólicas. A sua ausência ou insuficiência pode causar danos afetando algumas funções vitais desses micro-organismos (LOURENÇO, 2006). Dentre os nutrientes mais importantes estão o fósforo e o nitrogênio, os quais existem no ambiente aquático de diversas formas como: dissolvidos, particulados ou na

forma biótica. Entretanto, apenas a forma dissolvida é diretamente disponível para o crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006).

As microalgas possuem grande capacidade de absorver os nutrientes mesmo quando muito diluídos no meio ambiente. Os elementos presentes de forma abundante no meio externo das células tendem a ser acumulados intracelularmente (REYNOLDS, 2006). Desta forma, as proporções dos elementos encontrados na composição celular das microalgas, geralmente refletem as condições de disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. Portanto, as proporções e quantidades absolutas de vários dos componentes elementares da célula estão sujeitos a grandes variações. Estas dependem da capacidade de absorção das microalgas e mecanismos de estoque nutricional quando em ambientes instáveis (REYNOLDS, 2006).

Alguns processos biotecnológicos com microalgas têm como objetivo principal alcançar altos rendimentos celulares e para isso deve-se assegurar um fornecimento adequado de macronutrientes. Os meios de cultura são formulados para conter nutrientes em excesso, assegurando que nunca se tornem um fator limitante. Porém, em algumas aplicações biotecnológicas específicas, os nutrientes são fornecidos em concentrações limitantes para se obter os resultados esperados. Por exemplo: Estresse de N e sal para a síntese máxima de carotenóides em *Dunaliella salina* visando produção de beta-caroteno (BEN-AMOTZ & AVRON, 1989), ou carboidratos, óleos e gorduras em várias espécies de algas (BOROWITZKA, 1988), ou ácidos graxos poli-insaturados (GARCIA *et al.*, 2000) em crescimento mixotrófico de algas.

1.2.1 Meios de Cultivo

A manutenção correta das cepas de microalgas depende da escolha do meio de cultura e os parâmetros físico-químicos adequados. No momento da escolha do meio de cultura, o habitat natural das espécies em questão deve ser levado em consideração para determinar as necessidades básicas para seu crescimento (BARSANTI & GUALTIERI, 2006).

Outro fator muito importante para a decisão a respeito do meio de cultura é o propósito para qual a microalga será cultivada. A manutenção de culturas em banco de cepas, ou crescimento visando máximo rendimento de biomassa, ou condições de estresse nutricional para otimizar a biossíntese de biocompostos são três objetivos diferentes que necessitam de diferentes formulações da receita nutricional. Um exemplo interessante ocorre no cultivo comercial de *Dunaliella*, onde a produção de beta-caroteno é elevada utilizando a técnica de cultivo de duas fases. Na primeira, utiliza-se fotobioreatores com excesso de N e baixa salinidade para a otimização da síntese de biomassa. Na segunda, os reatores apresentam redução na concentração de N e alta salinidade visando otimizar a produção de beta-caroteno (BEN-AMOTZ, 1995).

1.2.2 Condições de Estresse

Vários são os fatores que podem levar a uma condição de estresse para as microalgas. As concentrações de certos nutrientes, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e pH são os mais estudados atualmente. As diferentes espécies de microalgas respondem de forma particular às alterações nutricionais no ambiente externo. Porém, um padrão conservado é a

capacidade de adaptação que esses organismos apresentam frente a variadas condições. Por exemplo, um estudo recente feito por Aubriot *et al.* (2011), demonstrou que o fitoplâncton que crescia no lago Rodó (Montevideo, Uruguai) era limitado pela disponibilidade de fosfato, que variava em uma faixa crítica de concentração, dificultando sua absorção e incorporação em corpos de polifosfato. Nesse caso, quando a concentração de fosfato na água era aumentada ocasionalmente como pulsos periódicos (ex: liberação de fezes por animais aquáticos), essa comunidade era capaz de adaptar-se aos pulsos de fosfato e regular suas propriedades cinéticas de absorção do fósforo.

Aubriot *et al.* (2011) demonstraram que a absorção de fosfato e o crescimento celular não estão diretamente acoplados. A absorção pode ocorrer quando as células não estão em crescimento e o crescimento celular pode ocorrer em momentos que a concentração externa do fosfato é baixa, porém utilizando reservas intracelulares de fosfatos previamente acumuladas na forma de corpos de polifosfatos estocados (AUBRIOT *et al.*, 2011).

A limitação de nutrientes nos meios de culturas é a condição de estresse em microalgas mais estudada, devido aos resultados fisiológicos obtidos. O fornecimento de nutrientes afeta em grandes proporções a composição química das algas assim como sua taxa de crescimento (REYNOLDS, 2006).

Resultados experimentais mostram que células em condições de deficiência de fósforo podem alcançar taxas de absorção mais elevadas do que células em condições saturantes de fosfato. Nessas condições, as células podem absorver de 8-16 vezes mais do que o mínimo da quota celular, convertendo o fosfato em “pools” internos de corpos de polifosfato e sustentar

de 3-4 gerações de crescimento em condições de depleção de fosfato (YAO *et al.*, 2011).

As microalgas representam um sistema experimental singular para o estudo de respostas ao estresse de organismos fotossintetizantes, possibilitando o estudo dos processos metabólicos e moleculares associados com a resposta e adaptação dos organismos fotossintéticos ao estresse (BARSANTI & GUALTIERI, 2006). O estudo do estresse fisiológico e adaptação das microalgas possuem também uma importante aplicação no desenvolvimento biotecnológico para o cultivo em massa das microalgas.

O estímulo ao acúmulo de produtos de alto valor agregado está associado com condições de estresse, como é o caso do acúmulo de ácidos graxos em geral, por limitação de nutrientes. O aprimoramento do conhecimento da resposta fisiológica pode ajudar no desenvolvimento de um melhor sistema de produção para o composto de interesse e futuramente, permitirá uma visão do potencial de modificação genética de cepas escolhidas (BARSANTI & GUALTIERI, 2006).

1.2.3 Fósforo

O fósforo é um importante fator limitante em vários ecossistemas, onde sua deficiência afeta diretamente o crescimento do fitoplâncton. O fósforo é essencial para o crescimento celular e vários processos celulares como transferência de energia (ATP), biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídeos, DNA, etc. O ortofosfato inorgânico (PO_4^{-3}) é a forma iônica de fósforo de uso

preferencial pelas microalgas e sua absorção é dependente de energia. Portanto, esta é a fonte de P mais utilizada nos meios de cultura. A maioria das microalgas é capaz de produzir fosfatases de superfície celular o que as possibilita usar várias formas de fosfato inorgânico como fonte de fósforo (BARSANTI & GUALTIERI, 2006). Existem outras fontes de fósforo inorgânico que podem ser absorvidas pelas microalgas, como o fosfato diácido (H_2PO_4^-) e o fosfato ácido (HPO_4^{2-}). Estes podem ser provenientes do ácido fosfórico (H_3PO_4) (REYNOLDS, 2006). Apesar da biomassa das algas conter menos que 1% de P, ele é um dos mais importantes fatores limitantes do crescimento, na aplicação biotecnológica de algas, pois se liga facilmente a outros íons (ex: CO_2^{-3} e ferro) resultando na sua precipitação e conseqüentemente tornando-se indisponível para a absorção. Várias espécies de microalgas também são capazes de estocar P em excesso em corpos de polifosfatos durante a absorção em condições luxuriantes. Estes podem ser usados quando o meio externo se torna limitante para esse fator nutricional. A demanda de P também influencia na composição da biomassa produzida. O conteúdo de lipídeos e carboidratos é afetado pela demanda interna e externa do P (BOROWITZKA, 1988). Em condições de limitação desse nutriente, o conteúdo de lipídeos aumenta e o crescimento celular é afetado negativamente.

Atualmente o nutriente mais utilizado para a realização de estudos fisiológicos de microalgas é o nitrogênio. Por isso, existe uma carência de informações atuais na literatura referente à manipulação do fósforo no campo de fisiologia de microalgas. Portanto, é importante o desenvolvimento de mais estudos ecofisiológicos utilizando o nutriente fósforo.

1.3 Lipídeos de Microalgas

Os lipídeos se caracterizam pela alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Juntamente com as proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, os lipídeos são componentes essenciais das estruturas biológicas. Essa biomolécula essencial está presente na membrana celular (ex: fosfolipídeos), como metabólitos secundários (ex: ácidos graxos) e em produtos de reserva (ex: triacilgliceróis), que podem ser acumulados em gotas de óleo alocadas no citoplasma. Os lipídeos podem ser classificados em ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídeos, esfingolipídeos, esteróides e prostaglandinas. A maioria dos lipídeos é derivada ou possui na sua estrutura ácidos graxos. Em sua maioria ocorrem combinados com membros de outras classes de biomoléculas, produzindo, por exemplo, glicolipídeos e lipoporteínas. A maioria dos lipídeos neutros são triglicerídeos e ácidos graxos livres (BARSANTI & GUALTIERI, 2006).

O conteúdo lipídico está presente naturalmente em algas autotróficas e varia de acordo com a espécie, nutrição, época e estágio de crescimento da alga (NARENDRA *et al.*, 2010). O aumento desse composto pode ser estimulado artificialmente utilizando técnicas de limitação de nutrientes no meio.

Os lipídeos das algas são compostos normalmente de glicerol, açúcares ou bases esterificadas para ácidos graxos com cadeias de 12-22 carbonos. Eles podem ser saturados ou insaturados. Algas eucarióticas possuem predominantemente ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Os triglicerídeos são os lipídeos de estoque mais comumente encontrados,

constituindo mais de 80% da fração de lipídeos totais. Uma característica das clorofíceas é o fato da ligação dupla insaturada ser na posição ômega-3, enquanto que as cianobactérias possuem na posição ômega-6 (BECKER, 2004). Na Tabela 1 podemos observar os principais lipídeos de algas.

As proporções dos ácidos graxos podem ser afetadas por fatores nutricionais e ambientais, assim como o conteúdo lipídico total. O crescimento celular e síntese de ácidos graxos das microalgas são diretamente afetados pela composição do meio de cultura e condições ambientais em que são expostas (ex. limitação de nutrientes). A produção dos lipídeos pode ser estimulada sob condições de limitação do crescimento, como a limitação de nutrientes, dessa forma, a síntese de lipídeos de reserva se destaca durante a fase estacionária (HU, 2004).

Tabela 1 - Principais lipídeos de algas (% de peso seco de biomassa) (BECKER, 2004).

Ácido graxo	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Dunaliella bardawil</i>
Ácido Láurico (12:0)	0,04 %	0,3 %	-	-
Ácido Palmítico (16:0)	45,5 %	16,0 %	20,4 %	41,7 %
Ácido Palmitoléico (16:1)	9,6 %	8,0 %	5,8 %	7,3 %
Ácido Esteárico (18:0)	1,3 %	0,3 %	15,3 %	2,9 %
Ácido Oléico (18:1)	3,8 %	8,0 %	6,6 %	8,8 %
Ácido Linoléico (18:2)	14,5 %	6,0 %	1,5 %	15,1 %
Referências	Hudson & Karis (1974)	Kenyon <i>et al.</i> (1972)	Spoehr & Milner (1949)	Fried <i>et al.</i> (1982)

O conteúdo de ácidos graxos é diferente de acordo com o grupo taxonômico, apesar de existirem discrepâncias entre organismos da mesma classe. Dentre os vários ácidos graxos de origem microalgal, os comercialmente relevantes são os ácidos graxos essenciais poliinsaturados (PUFAs), como ácido linoléico (18:2), α -linolênico (18:3), araquidônico (20:4) e eicosapentaenóico (20:5). Alguns dos ácidos graxos de microalgas com potencial para utilização na produção de biodiesel são: ácido oléico (18:1), linoléico (18:2), esteárico (18:0), palmítico (16:0), undecaenóico (11:0), duodecaenóico (12:0), cis-eicoesaenóico (20:1) e heptadecaenóico (17:0).

Clorofíceas (*Dunaliella* sp. e *Chlorella* sp.) são deficientes em PUFAs C20 e C22, apesar de algumas espécies terem pequenas quantidades de EPA (ácido graxo eicosapentaenóico) (acima de 3.2%). Devido à deficiência de PUFA, as clorofíceas geralmente têm baixo valor nutricional e não são utilizadas isoladamente para dieta humana. No final da fase logarítmica, as clorofíceas apresentam 23% de ácidos graxos saturados. Essas moléculas podem ter sua produção aumentada com alterações nas condições de cultivo, como por exemplo, na limitação de nutrientes e altas intensidades luminosas (BARSANTI & GUALTIERI, 2006).

Com algumas exceções, microalgas de diferentes origens tendem a ser parecidas umas com as outras em relação à composição celular. Principalmente nas quantidades relativas de proteína, carboidratos e lipídeos, quando o cultivo é mantido sob condições favoráveis. Entretanto, para algumas espécies em particular a variação na composição da célula pode diferir muito de acordo com as condições de escolha para o cultivo.

O conteúdo lipídico nesses organismos varia em média entre 1-40% em certas condições, podendo alcançar mais de 85% do peso seco. Um estudo pioneiro, sugeriu que *Ankistrodesmus braunii* durante a fase estacionária sintetiza uma quantidade de lipídeos igual ou superior a *Chlorella sp.* e outros organismos relacionados (MCMILLAN, 1957). Algumas espécies como a *Chlorella sp.*, *Botryococcus braunii*, e *Dunaliella salina*, quando expostas a condições ambientais desfavoráveis podem acumular mais de 80% de ácidos graxos, ou 80% de hidrocarbonetos ou 40% de glicerol, respectivamente, com base no peso seco (HU, 2004). O cloroplasto e as inclusões lipídicas representam uma importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) como os ácidos: eicosapentanóico (EPA / 20:5), docosahexanóico (DHA / 22:6) e araquidônico (AA / 20:4) (POHL, 1982).

As microalgas podem ter sua composição alterada significativamente quando cultivadas até a fase estacionária em limitação de nitrogênio ou fósforo. Nessa etapa, os níveis de carboidratos podem dobrar a custo da redução na síntese de proteínas. Na ausência do nitrogênio a alga continua a fixar o carbono, porém não sintetiza proteínas. Como resultado, o carbono é utilizado principalmente para a produção de compostos pobres em nitrogênio como lipídeos e carboidratos (HU, 2004).

Algumas espécies como *Dunaliella sp.* ou *Tetraselmis suecica* respondem inversamente a limitação de nitrogênio, diminuindo o conteúdo lipídico e produzindo carboidratos no lugar de lipídeos. Além do nitrogênio, outras deficiências nutricionais podem levar ao aumento do conteúdo lipídico, como a limitação de fósforo. As diatomáceas são organismos que alteram seu metabolismo com uma maior produção de lipídeos quando em limitação de

sílica. As cianobactérias não são caracterizadas por uma alteração significativa dos ácidos graxos ou composição lipídica em resposta a falta de nitrogênio. Ou seja, as clorofíceas são mais interessantes do que as cianobactérias para a manipulação e otimização de cultivos visando rendimento de biomassa para o acúmulo da composição lipídica (BECKER, 2004).

1.4 Chlorophyceae

Sabendo-se das vantagens da utilização de microalgas para o aproveitamento biotecnológico de vários de seus produtos conforme citado anteriormente, as clorofíceas são as mais promissoras para a produção de biodiesel. A classe Chlorophyceae é formada de micro-organismos eucarióticos autotróficos, também chamados de algas verdes devido sua pigmentação (REYNOLDS, 2006). Abrangem um grande grupo de organismos com enorme variedade morfológica, incluindo formas unicelulares, coloniais e filamentosas (REYNOLDS, 2006). Os gêneros mais amplamente utilizados são: *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Haematococcus* e *Dunaliella* (ROSENBERG *et al.*, 2008). Elas possuem clorofila-a e -b, xantofilas: luteína e prasinoxantina e os carotenóides α , β , e γ que podem ser sintetizados e acumulados fora do cloroplasto sob condições de limitação de nitrogênio e/ou outras situações de estresse, o que acarreta em uma coloração amarelada das células. O produto fotossintético de armazenamento é o amido que é composto de amilose e amilopectina (REYNOLDS, 2006). Ao contrário de outras algas, o amido é formado dentro do cloroplasto. As algas verdes são cosmopolitas habitando os

mais diversos ambientes. Entretanto a maioria é de água doce (cerca de 90%), constituindo a maior parte do fitoplâncton de água doce (REYNOLDS, 2006).

Alguns exemplos importantes com aplicação comercial de membros do grupo Chlorophyceae são: *Chlorella sp.*, gênero mais importante na aplicação biotecnológica, sendo cultivada e comercializada como alimento humano (MENDOZA, 2011). Além disso, foi a primeira alga a ser isolada em cultura pura visando estudos sobre fotossíntese; *Dunaliella sp.*, extensivamente estudada e comercializada como fonte natural de beta-caroteno; *Ankistrodesmus sp.*, estudada visando a aplicação biotecnológica para produção de biodiesel (MENDOZA, 2011).

As Chlorophyceae são as microalgas mais utilizadas na produção de biodiesel devido sua característica de altas taxas de crescimento e altas densidades populacionais. De modo que, em boas condições de cultivo as células podem duplicar sua biomassa em poucos dias. Além disso, o conteúdo lipídico encontrado nesses organismos é alto alcançando valores acima de 50% (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

1.4.1 Lipídeos para a Produção de Biocombustíveis

Atualmente já se sabe que o uso contínuo de combustíveis fósseis não é mais sustentável, isso devido há uma série de fatores, entre eles, o acúmulo de CO₂ no ambiente e as alterações políticas e econômicas em torno dos principais países produtores de petróleo. A necessidade de fontes renováveis, carbono neutro, é evidente e urgente tanto para o meio ambiente quanto para a economia mundial. Atualmente, a grande maioria do biodiesel comercializado é proveniente de óleos vegetais, principalmente soja, girassol e palma e é

produzido através de uma reação de transesterificação (MENDOZA, 2011). Nesta reação química, o óleo (geralmente triacilgliceróis) reage com metanol ou etanol através de um catalizador (base ou ácido forte) resultando em ésteres de ácido graxo de cadeia longa (biodiesel) e uma molécula do co-produto glicerol. Porém é possível também ser produzido a partir de gordura animal e óleo de fritura (CHISTI, 2007; GRIFFITHS & HARRISON, 2008).

Entretanto, essas fontes não podem suprir de fato a demanda atual de combustíveis para o transporte. Portanto, um grande investimento vem sendo feito para a utilização das microalgas como uma fonte alternativa de matéria-prima para esta finalidade (CHISTI, 2007; GRIFFITHS & HARRISON, 2008).

As microalgas podem fornecer diversos tipos de biocombustíveis renováveis. Podemos citar: o metano produzido a partir de digestão anaeróbica da biomassa microalgal; o biodiesel produzido a partir do óleo/lípido extraído; e o bio-hidrogênio produzido durante a fotossíntese (CHISTI, 2007).

Os lipídeos de microalgas têm sido muito estudados também devido seu interesse comercial nutricional e farmacêutico. Como por exemplo, o ácido linoléico que é utilizado como suplemento alimentar. Dentre alguns dos muitos ácidos graxos produzidos por esses organismos, estão aqueles de interesse biotecnológico para a produção de biocombustíveis (ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa) (BECKER, 2004).

As microalgas podem ser utilizadas como terceira geração na produção de biocombustíveis e apresentam vantagens em relação aos vegetais superiores. Por exemplo, a não utilização de terras destinadas para agricultura, rápido crescimento celular, possibilidade de colheita contínua, não necessidade de água adequada para o abastecimento público para seu cultivo, alta

eficiência fotossintética e maior produtividade lipídica. Na Tabela 2 podemos observar alguns dados teóricos que corroboram a justificativa do uso de microalgas como fonte para produção de biodiesel devido sua maior eficiência em produção de óleo quando comparadas com os vegetais superiores (CHISTI, 2007).

Tabela 2 – Dados teóricos comparativos entre fontes de biodiesel (CHISTI, 2007).

Comparação entre algumas fontes de biodiesel			
Cultivo	Rend. Óleo (L/ha)	Área de plantio necessária (M ha) ^a	(%) de área cultivável existente EUA ^a
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Óleo de Palma	5950	45	24
Microalga ^b	136.900	2	1,1
Microalga ^c	58.700	4,5	2,5
^a Para suprir 50% de todo combustível utilizado no transporte nos EUA ^b 70% de óleo por peso seco (biomassa) ^c 30% de óleo por peso seco (biomassa)			

Entretanto, o maior problema atualmente enfrentado para a sua comercialização é a questão econômica, pois o valor do produto final (biocombustível) ainda é mais barato do que o gasto para sua produção. Atualmente, a produção em larga escala de biomassa de microalgas necessita

de insumos de combustíveis fósseis, ou seja, no ciclo de produção do biocombustível, combustíveis fósseis são utilizados para a construção das instalações de produção (reatores) e para atividades operacionais (mistura, coleta e processamento da biomassa, fornecimento de nutrientes e etc.) (REIJNDERS, 2008). Porém, as microalgas parecem ser a única fonte renovável para produção de biodiesel com capacidade de suprir a demanda global de combustíveis no setor de transporte (MENDOZA, 2011).

Um aspecto positivo para o uso biotecnológico das microalgas seria o fato delas consumirem CO₂ atmosférico. Portanto, o cultivo em larga escala torna-se importante para a remediação dos gases liberados na atmosfera pela combustão por usinas e outras fontes (ROSENBERG *et al.*, 2008).

Além disso, atualmente existem campanhas contra o uso de terras cultiváveis para a produção de combustíveis, que poderiam ser usadas para produção de alimentos para os humanos e animais. Esse problema é persistente, pois a produção de biocombustíveis atual é proveniente apenas de vegetais superiores e a utilização de fonte alimentar humana para produção de biocombustíveis poderia afetar o preço do mercado de alimentos (GRIFFITHS & HARRISON, 2008). Por isso, o cultivo de microalgas ajudaria em um problema entre a produção alimentar e produção de biocombustíveis, já que não é necessário o uso de terras férteis nem de irrigação para o cultivo desses organismos (MENDOZA, 2011).

Por outro lado, a produção de biodiesel a partir de microalgas é tecnicamente viável, porém ainda não se mostra economicamente interessante. Apesar de existir tecnologia para tal, questões operacionais dificultam o processo, dentre estes estariam os insumos necessários para injeção de CO₂,

energia para agitação do meio de cultura, controle de temperatura, entre outros. As principais questões econômicas são produtividade de biomassa, seguido de custos operacionais e de colheita das células (GRIFFITHS & HARRISON, 2008). O que leva a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de produção com custo-benefício positivo que permitam uma alta produção de biomassa, colheita desta e extração do óleo. Adicionalmente, é necessário o estudo de técnicas de otimização das condições nutricionais e ambientais dos cultivos de microalgas, visando um maior rendimento de biomassa e produtividade lipídica com um perfil de ácidos graxos de interesse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ortofosfato no crescimento e produção de lipídeos por microalgas e analisar os lipídeos extraídos e ácidos graxos produzidos visando à produção potencial de biodiesel.

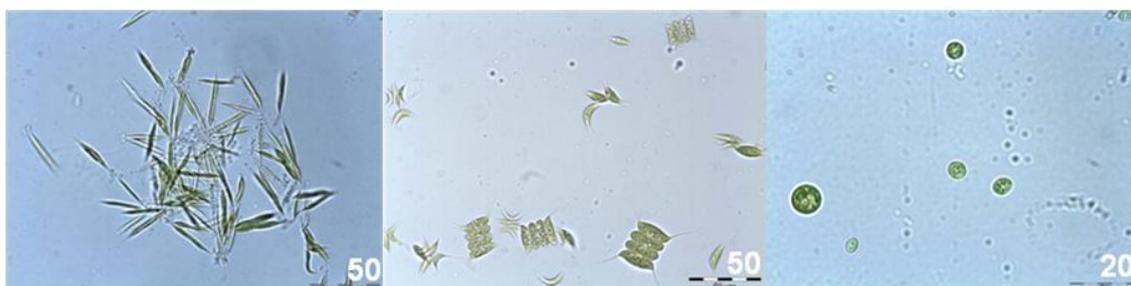
2.2 Objetivos Específicos

- 1) Selecionar uma espécie de microalga (Chlorophyceae) produtora de lipídeos, a partir de um teste piloto com cepas pertencentes ao banco de cultura do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC).
- 2) Avaliar o efeito da redução da concentração de ortofosfato no crescimento e produção de lipídeos por *Ankistrodesmus sp.*
- 3) Determinar o perfil dos ácidos graxos produzidos.
- 4) Definir a melhor condição de cultivo para obtenção de um conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos de interesse para a produção de biodiesel.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção da cepa para o estudo com variação nutricional

A seleção da cepa foi realizada através de um experimento prévio, onde foram testadas três linhagens de clorófitas (*Chlorella sp.* CLRF-01, *Desmodesmus sp.* DERF-01 e *Ankistrodesmus sp.* ANRF-01). As cepas unialgais e não-axênicas foram obtidas do banco de cultura do LETC. Neste ensaio piloto foram determinados as curvas de crescimento e os conteúdos lipídicos dos respectivos organismos. As condições dos cultivos foram de 200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, fotoperíodo de 12 h, temperatura de 24 ± 2 °C, aeração constante com ar comprimido filtrado, meio ASM-1 com pH inicial de 8,0, duração de 15 dias de cultivo tipo batch (fechado). Cada linhagem foi testada em cada uma das três intensidades luminosas e os cultivos ocorreram em balões de vidro com capacidade de 6 L de volume. A utilização de três diferentes intensidades luminosas foi devido o interesse em observar o comportamento das cepas em médias e altas intensidades para um futuro estudo com variação de luz, a ser desenvolvido com a cepa mais promissora em relação ao conteúdo lipídico.



Ankistrodesmus sp. (ANRF-01)

Desmodesmus sp. (DERF-01)

Chlorella sp. (CHLRF-01)

3.2 Micro-organismo estudado com variação nutricional e sua manutenção

Para este estudo foi utilizada uma cepa unialgal, não-axênica da microalga *Ankistrodesmus sp.* – (ANRF-01). A cepa escolhida para o estudo foi obtida do banco de culturas do LETC, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da UFRJ. Este micro-organismo foi isolado pela equipe deste laboratório a partir de amostras de água provenientes do Reservatório do Funil-RJ (ambiente aquático estudado pelo LETC há mais de 15 anos).

A manutenção de ANRF-01 foi realizada em tubos de ensaio com meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) e repiques feitos periodicamente a cada 15 dias. As condições para o cultivo foram de 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, fotoperíodo de 12 h, temperatura de 24 ± 2 °C e pH inicial 8,0.

3.3 Preparação dos meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado no experimento com variação nutricional foi preparado utilizando água milliQ e sais inorgânicos, preconizados para o meio ASM-1, que estão descritos na Tabela 3. O experimento foi realizado em três condições distintas no que se refere à concentração inicial de fósforo inorgânico no meio de cultivo. O controle foi desenvolvido em meio ASM-1 que possuiu 227 μM de PO_4^{-3} . A condição de tratamento 1 correspondeu ao meio ASM-1 com 22,7 μM de PO_4^{-3} , sendo chamada de P10. A condição de tratamento 2 correspondeu ao meio ASM-1 com 4,54 μM de PO_4^{-3} , sendo chamada de P50. Ressaltamos que, com exceção do ortofosfato, as demais concentrações dos outros macro e micronutrientes utilizadas na composição do

meio ASM-1 foram as mesmas para as três diferentes condições de cultivo (controle, P10 e P50). A condição P10 e P50 se referem à redução de 10 vezes e 50 vezes, respectivamente, da concentração inicial de ortofosfato do meio ASM-1.

Tabela 3 - Composição do meio ASM-1 em [$\mu\text{mol/L}$] (GORHAM *et al.*, 1964)

NaNO_3 [2000]	MgSO_4 [200]	MgCl_2 [200]	CaCl_2 [200]	K_2HPO_4 [100]
Na_2HPO_4 [100]	FeCl_3 [4]	H_3BO_3 [40]	MnCl_2 [7]	ZnCl_2 [3,2]
CoCl_2 [0,08]	CuCl_2 [0,0008]	$\text{Na}_2\text{. EDTA}$ [20]		

3.4 Condições de cultivo

O inóculo utilizado para o experimento com variação nutricional foi previamente aclimatado por 7 dias em intensidade luminosa de 500 μmoles fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após este período um número de células de $2,3 \times 10^5$ células/mL foi inoculado nas três diferentes condições. Controle, P10 e P50, que foram cultivadas em triplicatas.

As condições de cultivo, assim como a aclimação do inóculo foram: fotoperíodo de 12 h, temperatura de 24 ± 2 °C, aeração constante com ar comprimido filtrado, intensidade luminosa de 500 μmoles fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH inicial dos meios corrigidos para 8,0. A duração do estudo foi de 19 dias em cultivo tipo batch (fechado). A temperatura do meio de cultura foi medida utilizando um recipiente com água milliQ de mesmo volume que o do meio de cultivo, ao qual um termômetro digital foi mergulhado e permaneceu ao longo dos 19 dias nas mesmas condições de luz que os frascos de cultivo. A média da variação de temperatura para uma intensidade luminosa idêntica a que o

experimento foi exposto ($500 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi ent\u00e3o determinada. A escolha da intensidade luminosa de $500 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ utilizada nesse experimento foi em decorr\u00eancia dos resultados obtidos nessa intensidade que foram os mais promissores para conte\u00fado lip\u00eddico, entre as tr\u00eas cepas testadas no experimento pr\u00e9vio de sele\u00e7\u00e3o da cepa ANRF-01. Al\u00e9m disso, essa intensidade luminosa pode ser considerada uma intensidade mediana em rela\u00e7\u00e3o ao obtido na superf\u00edcie do espelho d'\u00e1gua ($1000 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de onde a cepa ANRF-01 foi isolada. Adicionalmente, o presente experimento foi realizado em conjunto com um estudo da varia\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa utilizando o mesmo organismo. A condi\u00e7\u00e3o controle do estudo com intensidades luminosas foi $500 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e as condi\u00e7\u00f5es de cultivo foram as mesmas, logo essa escolha permitiu uma compara\u00e7\u00e3o dos resultados ao final dos experimentos.

3.5 Amostragens para as an\u00e1lises fisiol\u00f3gicas

No momento das amostragens o meio de cultivo foi homogeneizado, atrav\u00e9s de agita\u00e7\u00e3o, para garantir a reprodutibilidade entre as r\u00e9plicas. O crescimento celular, concentra\u00e7\u00e3o de clorofila-a, quantifica\u00e7\u00e3o de carboidratos intra e extracelulares e an\u00e1lises de nutrientes foram acompanhados em dias alternados ao longo do experimento. Amostragens para biomassa e conte\u00fado lip\u00eddico foram feitas no 5\u00b0 dia de experimento (T5), 9\u00b0 dia (T9), 13\u00b0 dia (T13) e 19\u00b0 dia (T19).

3.6 Curvas de crescimento

Para determinação do número de células, volumes de 5,0 mL de cada cultura foram amostrados e fixados com lugol neutro. O crescimento celular foi acompanhado por meio de contagem de células realizada em microscópio ótico modelo OLYMPUS BX51, utilizando câmara de Fuchs-Rosenthal. As taxas de crescimento (μ) foram determinadas conforme a fórmula descrita em Fogg & Thake (1987) apresentada abaixo:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

Onde: μ = taxa de crescimento

N_1 e N_2 = número de células/mL nos tempos t_1 (1º dia da fase exponencial) e t_2 (último dia da fase exponencial).

O rendimento máximo das culturas (R), que corresponde ao número máximo de células atingido ao final do cultivo dividido pelo número de células no inóculo inicial, foi obtido segundo Marinho & Azevedo (2007).

3.7 Quantificação de clorofila-a

A concentração de clorofila-a foi determinada por espectrofotometria, de acordo com o método tricromático de Jeffrey & Humphrey (1975). Foram filtrados volumes de 5,0 mL de cada cultura em filtros de borosilicato e estes foram acondicionados em papel alumínio e armazenados no freezer -80 °C até processamento. A extração de clorofila-a foi realizada com 7,0 mL de acetona 90% em tubos encapados com papel alumínio. O filtro foi macerado dentro de

cada tubo na presença da acetona e mantido sob refrigeração por 18 horas, sendo então centrifugados em rotação de 1188 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante formado foi utilizado para a determinação espectrofotométrica.

Foram determinadas as absorvâncias do extrato nos comprimentos de onda 750 nm, para correção de turbidez e, 665 nm, 647 nm e 630 nm, para clorofila-a, clorofila-b e -c, respectivamente. Os valores obtidos nas três leituras acima foram utilizados para o cálculo da concentração de clorofila-a de acordo com a equação proposta por Lorenzen (1967).

3.8 Quantificação de carboidratos intracelulares e extracelulares

O método utilizado nessa análise foi o proposto por Myklestad & Haug (1972), modificado de Dubois *et al.* (1956). Para a quantificação de carboidratos foi utilizado como padrão de referência glicose (Merck). Os carboidratos intracelulares foram quantificados a partir de 5,0 mL de cultura, filtrados em filtros de borossilicato previamente calcinados. Esses filtros foram então armazenados em papel alumínio e mantidos em freezer -80 °C até suas análises. Para extração dos carboidratos intracelulares, os filtros foram colocados em tubos de vidro de parede reforçada com 1,0 mL de ácido sulfúrico 80% e deixados por 20 h à temperatura ambiente em capela de exaustão. Posteriormente, a reação foi interrompida com adição de 6,0 mL de água milliQ e então a mistura centrifugada a 719 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e nele adicionado 250,0 µl de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico 100%. Após agitação por 20 segundos em vortex, foi aguardado o resfriamento do extrato à temperatura ambiente, por aproximadamente 30

minutos, para determinação da absorbância por espectrofotometria no comprimento de onda de 485 nm.

Os carboidratos extracelulares foram obtidos do filtrado de aproximadamente 5,0 mL de cultura. Ao filtrado foram adicionados 10,0 µl de azida sódica 0,5%, para armazenamento em geladeira até seu processamento. Para extração, 1,0 mL do filtrado foi colocado em tubo de vidro e adicionados 250,0 µL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico 100%. Após agitação por 20 segundos em vortex, foi aguardado o resfriamento à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para leitura no comprimento de onda de 485 nm em espectrofotômetro.

3.9 Quantificação de biomassa

A biomassa seca foi determinada a partir de 500,0 mL de cada cultura, que foram centrifugados a 4390 x *g* por 5 minutos a 2 °C para retirada do meio de cultivo e também para lavagem das células com água milliQ. Foram realizadas duas lavagens com 250 mL de água milliQ que tinham o objetivo de retirar o excesso dos sais proveniente do meio, buscando minimizar a influência da massa desses sais no momento de pesagem da biomassa seca. Após essa etapa, a biomassa úmida foi liofilizada. Através de gravimetria obteve-se o peso seco da biomassa seca com o uso da balança de precisão (mínimo 0,01 mg) da Mettler Toledo modelo AG 245.

3.10 Detecção de lipídeos intracelulares por fluorescência (“Nile Red”)

Essa etapa foi realizada em colaboração com a doutoranda Roberta Fernandes Pinto e o Prof. Dr. Celso Santana no Laboratório de Biologia do Instituto Nacional de Metrologia, Padronização e Qualidade Industrial (INMETRO), de acordo com o protocolo descrito por Greenspan *et al.* (1985).

A presença de lipídeos neutros no interior das células foi verificada através da marcação com o marcador Nile Red. As amostras das microalgas foram lavadas com tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline - PBS), pH 7,3 por 40 minutos em temperatura ambiente e fixadas em formaldeído 4%. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas em PBS e aderidas em lamínulas revestidas com poli-lisina 0,1%. As células foram coradas com Nile Red (100 µg/mL em PBS) durante 15 minutos em temperatura ambiente e o excesso do fluoróforo foi lavado com PBS. A observação das células foi realizada por microscopia (Axioplan Zeiss) acoplada a câmera digital (Hamamatsu color chilled 3000 – C5810) e a localização dos grânulos de lipídeos no interior das células por microscopia de fluorescência utilizando-se um microscópio confocal (Leica TCS SP5). O comprimento de onda utilizado no fluorímetro para excitação do fluoróforo foi de 485 nm, o de emissão 538 nm. No caso da fluorimetria, o valor excluído, considerado como “background”, foi de 530 nm.

3.11 Lipídeos (Extrato Bruto)

A extração dos lipídeos foi realizada pelo método de Folch *et al.* (1957) modificado. Primeiramente, a biomassa liofilizada foi macerada utilizando sílica gel 60 e um almofariz de cerâmica. A extração foi realizada com uma solução de Clorofórmio/Metanol ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) 2:1 v/v, em agitação por 4 h à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado em funil de vidro com filtro de sílica e reservado. O material celular foi novamente extraído em uma solução $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:2 v/v, sob as mesmas condições da primeira extração. A etapa de filtração foi realizada novamente e o segundo filtrado foi reunido ao anterior, sendo denominado de extrato bruto lipídico. O extrato bruto lipídico foi concentrado em rotaevaporador (Heidolph Hei-VAP) e então o seu peso seco determinado por método gravimétrico com o uso da balança de precisão (mínimo 0,01 mg) da Mettler Toledo modelo AG 245.

3.12 Fluxograma das etapas realizadas para análise dos ésteres

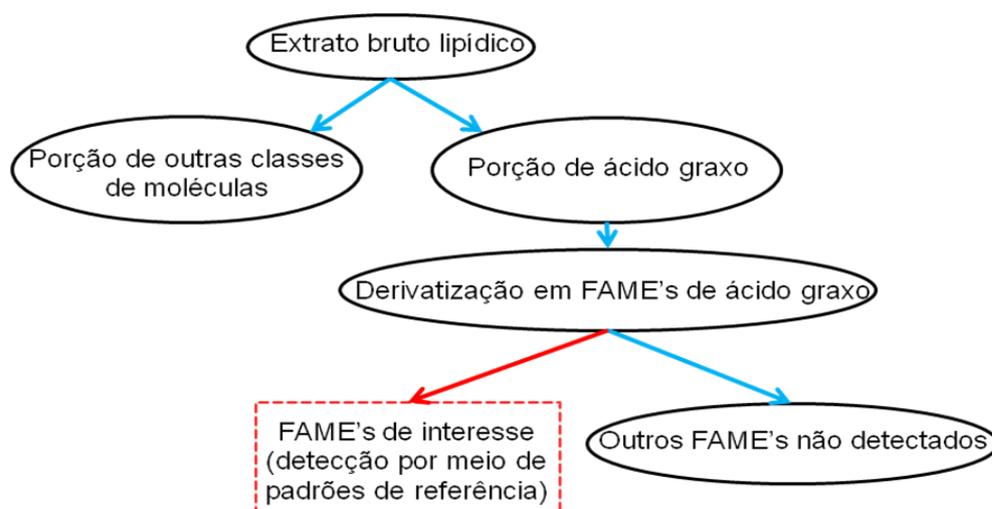


Figura 1 – Etapas realizadas para alcançar a análise final dos “FAME’s” de interesse.

3.13 Obtenção dos ésteres (“FAMEs” – Fatty acid methyl ester)

A partir do extrato bruto lipídico seco foi aplicado o método adaptado de Joseph & Ackman (1992) para a conversão dos ácidos graxos presentes em metil ésteres marcados com BF_3 (Borotrifluormetano 12% em metanol). Inicialmente foi acrescentado ao extrato uma base forte (NaOH $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em metanol), seguida por agitação em vortex por 30 segundos e aquecimento em banho termostaticado ($80\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$) por 5 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado o marcador BF_3 e o extrato foi novamente agitado e aquecido por 50 minutos. Esta mistura foi resfriada por exposição do frasco em água corrente e a seguir adicionou-se à mistura uma solução saturada de cloreto de sódio para separação de fases (lipídica e aquosa). Em seguida, foi adicionado n-hexano 85% sob agitação constante. A mistura foi então mantida em repouso sob refrigeração por 10 minutos, para melhor separação das fases. O sobrenadante referente aos ésteres da fase lipídica foi retirado, sendo o procedimento de adição de n-hexano 85% repetido para um melhor rendimento da extração desses ésteres. Por fim, os ésteres em solução de n-hexano 85% foram secos sob atmosfera de nitrogênio e mantidos sob congelamento para as análises por cromatografia gasosa.

3.14 Detecção dos “FAMEs” de interesse por Cromatografia Gasosa

As análises para identificar os ácidos graxos produzidos pelas microalgas e determinar suas respectivas concentrações por comparação com os padrões “FAME’s” foram realizadas pela técnica de Cromatografia Gasosa (CG).

Os ésteres de ácidos graxos obtidos pela derivatização 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 25 m, diâmetro interno de 250 μm e 0.25 μm 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 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de 1,0 μl . As temperaturas do injetor e do detector eram de 250 $^{\circ}\text{C}$, com isoterma de 200 $^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos. A quantificação dos resultados foi realizada com uma faixa de trabalho de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 40,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com método de padronização externa, onde é avaliada a resposta do analito em relação aos padrões de referência. Os padrões analíticos, (Sigma Aldrich), utilizados foram: Ácido octadecaenóico (ácido esteárico - C18:0), cis-9-octadecaenóico (ácido oléico – C18:1), cis-9 cis-12 octadecaenóico (ácido linoléico – C18:2), hexadecaenóico (ácido palmítico – C16:0), duodecaenóico (ácido láurico – C12:0), heptadecaenóico (margarato de metilo – C17:0), undecaenóico (ácido cáprico – C11:0) e cis-eicosaenóico (ácido gondóico – C20:1). A curva de calibração foi feita com cinco concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a injeção de cada ponto da curva foi realizada em triplicata. O limite de quantificação (L.Q.) desse procedimento foi de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o limite de detecção do método foi de 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.15 Nutrientes:

As variações das concentrações de nitrato e fosfato extracelulares, ao longo do desenvolvimento dos cultivos, foram analisadas por cromatografia de íons, com o equipamento ICS-1000 Dionex. A coluna de ânion e a pré-coluna utilizadas foram AS14A Dionex e AG14A Dionex, respectivamente. A fase móvel de ânion utilizada foi uma solução de carbonato de sódio (Spectrum) 8,0 mM e bicarbonato de sódio (Dionex) 1,0 mM. Os padrões de ânion Dionex utilizados continham concentração inicial de 100,0 mg.L⁻¹ para nitrato e 150,0 mg.L⁻¹ de fosfato.

Tabela 4: Curva de calibração com padrão de ânion (µg.L⁻¹)

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
PO ₄ ⁻³	6	12	24	48	60	120	240
NO ₃ ⁻	4	8	16	32	40	80	160

Para a análise dos nutrientes, um volume de aproximadamente 15,0 mL de filtrado de cada cultura foi obtido utilizando-se filtro de borosilicato. Este filtrado foi armazenado em frascos de plástico limpos e nunca utilizados. Os mesmos foram mantidos em freezer -20 °C até análise no cromatógrafo de íons. As amostras antes de serem injetadas no equipamento eram diluídas de acordo com a necessidade e filtradas em filtro de celulose regenerada (Sartorius) de porosidade 0,45 µm e tamanho de 13 mm.

3.16 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS Statistics 17.0, através da análise multivariada ANOVA e teste de Tukey.

3.17 Fluxograma Geral

Para facilitar a compreensão, encontra-se abaixo um fluxograma do trabalho realizado em etapas no presente estudo.

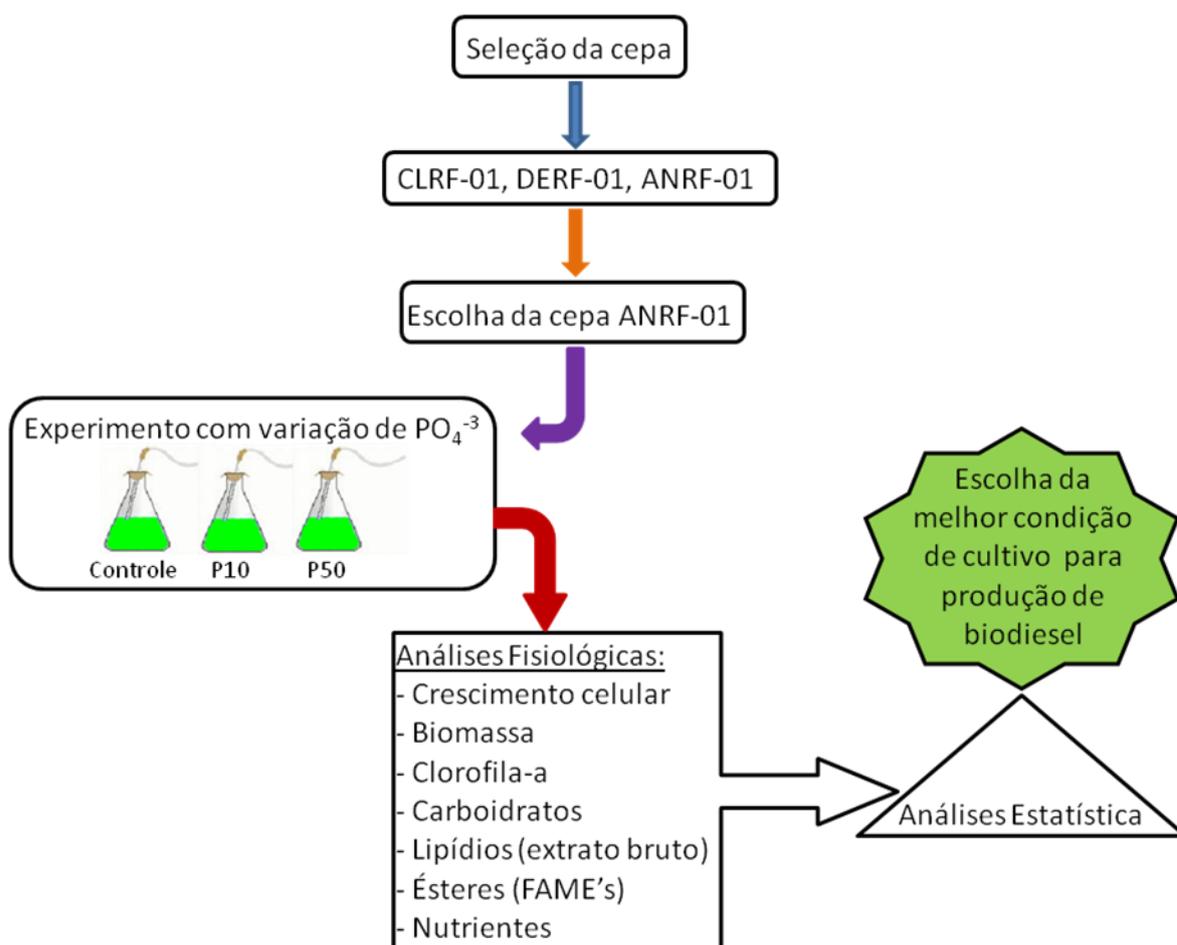


Figura 2 – Fluxograma geral de todas as etapas realizadas no presente estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção da cepa ANRF-01

As curvas de crescimento das três cepas de microalgas testadas para a seleção daquela que seria utilizada no experimento com variação nutricional podem ser observadas nas Figuras 3, 4 e 5. As diferentes intensidades luminosas testadas (200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para as três cepas (ANRF-01, DERF-01 e CHLRF-01), não refletiram diferença aparente nas curvas de crescimento até o 12^o dia de cultivo. A microalga que obteve o maior n\u00famero de c\u00e9lulas no \u00faltimo dia de experimento foi a CHLRF-01, seguida de DERF-01 e ANRF-01.

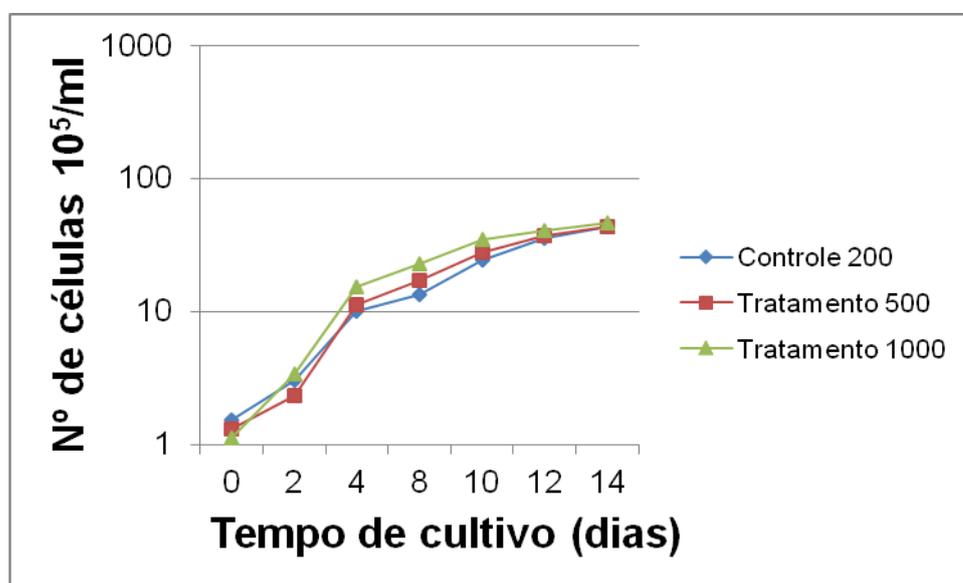


Figura 3 – Crescimento celular da cepa ANRF-01 em número de células/mL de cultura, nas três intensidades luminosas de 200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

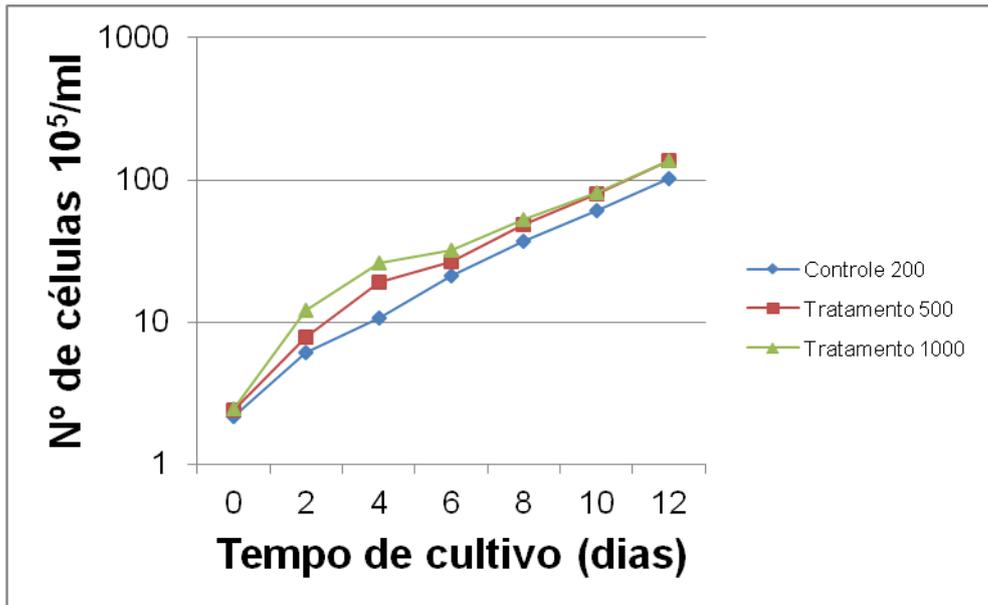


Figura 4 - Crescimento celular da cepa DERF-01 em número de células/mL de cultura, nas três intensidades luminosas de 200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

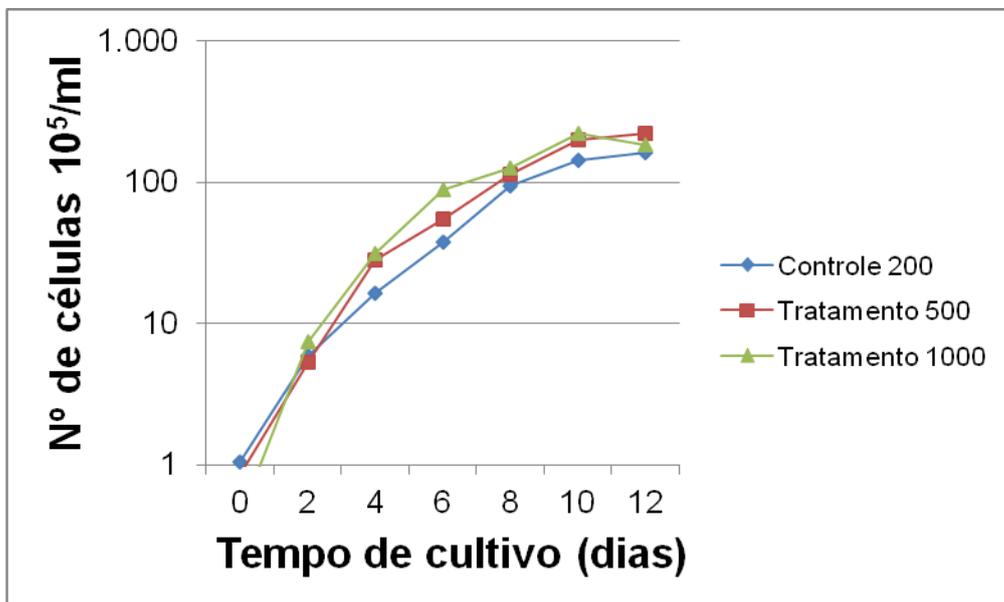


Figura 5 - Crescimento celular da cepa CHLRF-01 em número de células/mL de cultura, nas três intensidades luminosas de 200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O conteúdo lipídico por peso seco de biomassa pode ser observado na Figura 6. Entre as três cepas testadas, o micro-organismo *Akistrodesmus sp.* (ANRF-01) nas intensidades luminosas de 200 e 500 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi aquele com maior valor de lip\u00eddeo em porcentagem por peso seco, aproximadamente 30% e 27%, respectivamente .

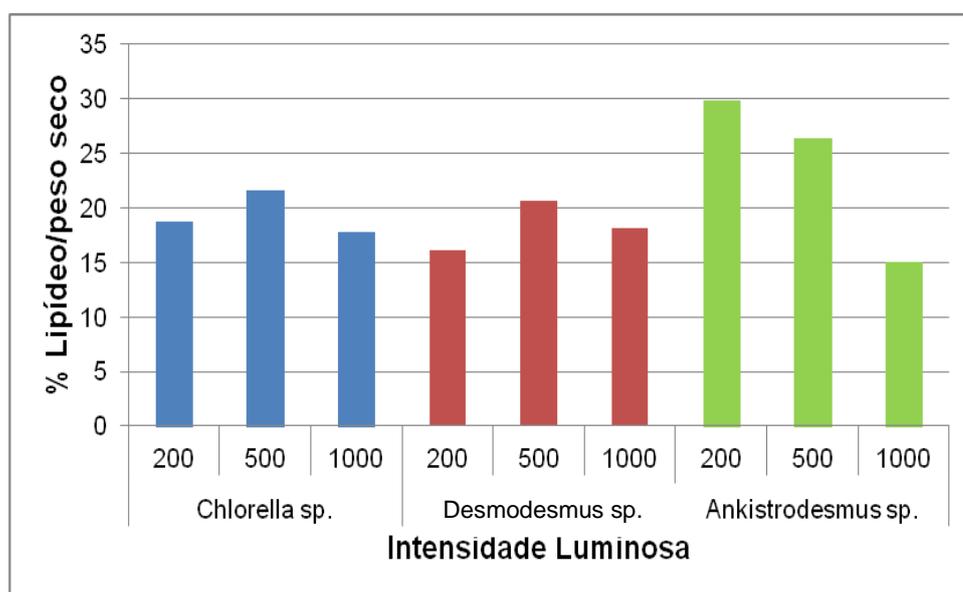


Figura 6 – Conte\u00fado de lip\u00eddeo em porcentagem (%) por peso seco de biomassa para CHLRF-01, ANRF-01 e DERF-01 nas tr\u00eas intensidades luminosas de 200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Na Figura 7 podemos notar que a cepa ANRF-01 obteve valores de intensidade de fluoresc\u00eancia significativamente maiores, para as tr\u00eas intensidades luminosas testadas em rela\u00e7\u00e3o \u00e0s cepas DERF-01 e CHLRF-01.

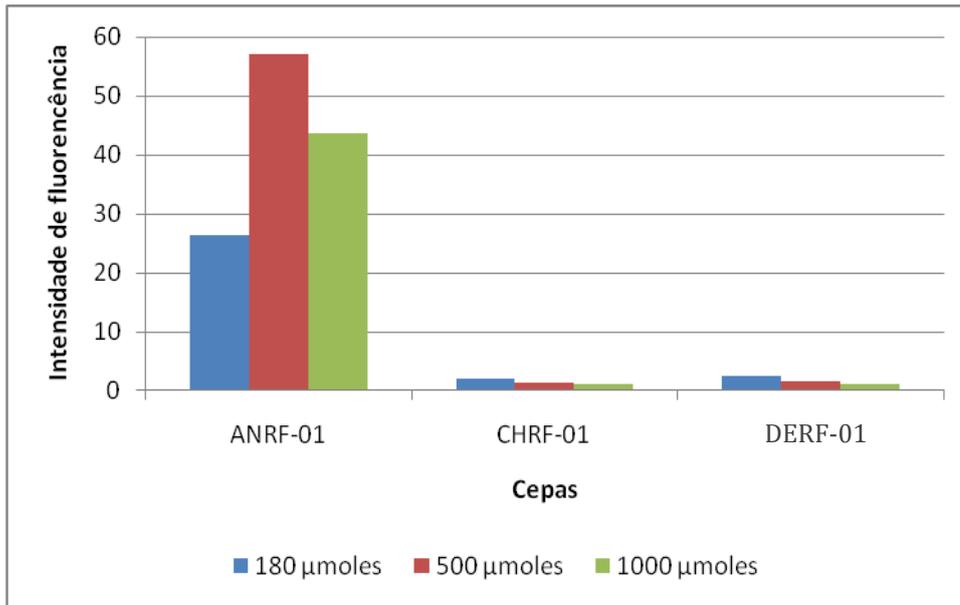


Figura 7 – Intensidade de fluorescência para as três cepas testadas (CHLRF-01, ANRF-01 e DERF-01) em três diferentes intensidades luminosas de 200, 500 e 1000 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Marcação com fluorocromo Nile Red para inferir a quantidade de lipídeos intracelulares através de fluorescência.

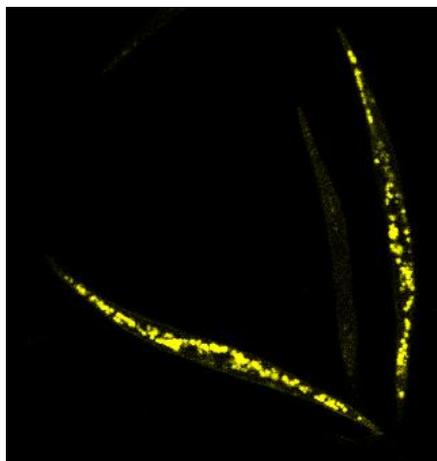


Figura 8 – Foto retina utilizando microscópio confocal de fluorescência da cepa ANRF-01 marcada com o fluorocromo Nile Red. Os grânulos amarelos representam os lipídeos neutros intracelulares.

Portanto, apesar da cepa ANRF-01 não ter alcançado o maior valor final de células para a curva de crescimento, os dados obtidos pela análise dos lipídeos (Figuras 6 e 7) indicam que este seria o organismo mais promissor para o acúmulo de lipídeos. Dessa forma, a cepa ANRF-01 foi a escolhida dentre as três microalgas testadas na seleção inicial para o estudo com variação nutricional.

4.2 Estudo com variação nutricional e a cepa ANRF-01

4.2.1 Crescimento Celular e Biomassa

A microalga *Ankistrodesmus sp.* (cepa ANRF-01) cultivada em meio ASM-1 controle apresentou um número máximo de células de $14,3 \times 10^6$ células/mL e biomassa seca de 780,0 mg/L de cultura, no 19º dia de cultivo. Na metade da duração do experimento, ou seja, no 9º dia, a biomassa seca atingida foi de 301,6 mg/L. Na condição controle foi obtido o maior crescimento celular e conseqüentemente apresentou o maior conteúdo de biomassa seca ao longo do experimento (Figura 9). Ao analisarmos a Figura 10, pode-se inferir que o número de células continuaria crescendo após o 19º dia, caso o cultivo fosse mantido por mais tempo. Ou seja, para a cepa estudada, o meio controle até 19 dias de cultivo ainda apresentava condições favoráveis para o crescimento celular. O rendimento máximo obtido foi de 62,5 (Tabela 5). A fase exponencial do crescimento foi observada entre os dias 1 e 7 de cultivo e a taxa de crescimento calculada para esse período foi 0,26 (Figura 10, Tabela 5).

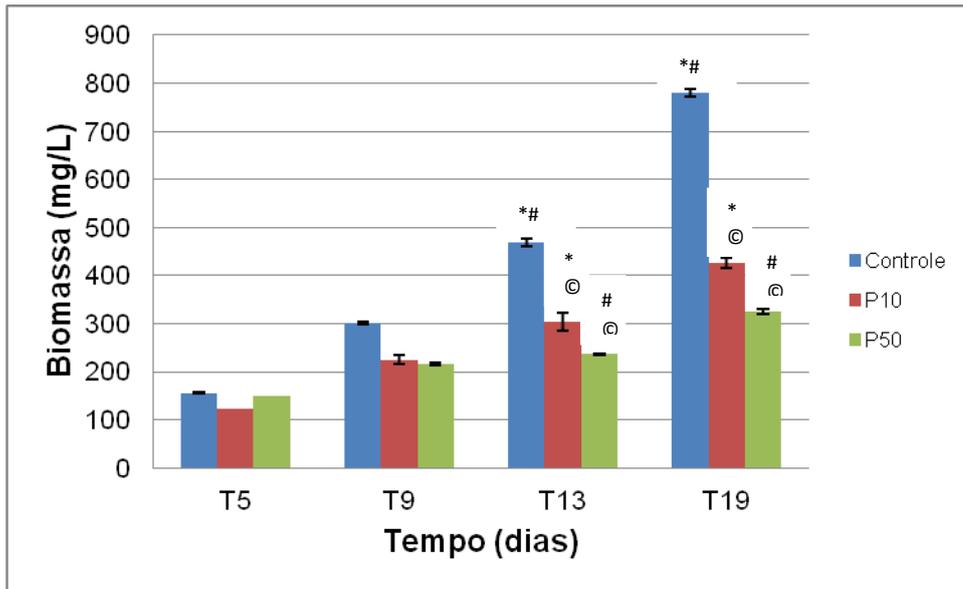


Figura 9 - Biomassa seca (mg/L) obtida em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam à média (n=3) ± erro padrão. Diferença estatística no 13º dia entre controle e P10 (*p<0,01), controle e P50 (#p<0,01) e P10 e P50 (@p<0,05) e no 19º dia entre controle e P10 (*p<0,01), controle e P50 (#p<0,01) e P10 e P50 (@p<0,05). (*, # e @ = diferença significativa).

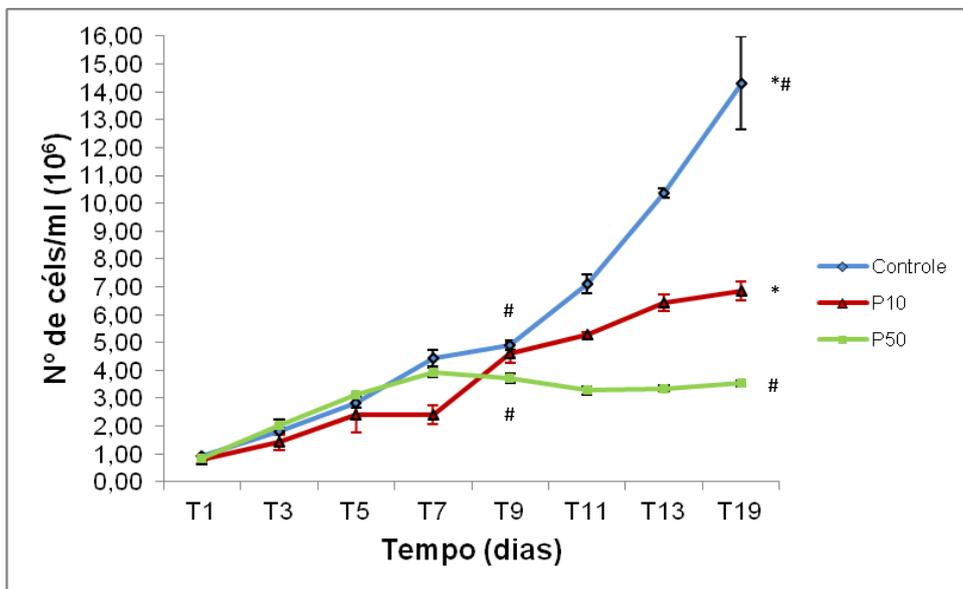


Figura 10 - Crescimento celular de ANRF-01 (10⁶ células/mL), nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média (n=3) ± erro padrão. Diferença estatística no 9º dia entre controle e P50 (#p<0,05) e no 19º dia entre controle e P10 (*p<0,01) e controle e P50 (#p<0,01). (* e # = diferença significativa).

Tabela 5 - Valores da taxa de crescimento (μ) e rendimento máximo (R), obtidos durante o experimento realizado com variação das concentrações de fósforo inorgânico (Controle, P10 e P50).

	Controle	P10	P50
Taxa de crescimento	0,26 [#]	0,27 [©]	0,33 ^{#©}
Rendimento máximo	62,5 ^{*#}	30 [*]	17,2 [#]

Legenda: Diferença estatística na taxa de crescimento entre controle e P50 ($\#p < 0,01$) e P10 e P50 ($©p < 0,05$). Diferença estatística no rendimento máximo entre controle e P10 ($*p < 0,05$) e controle e P50 ($\#p < 0,01$).

Na condição de cultivo P10, a curva de crescimento apresentou uma alteração em relação ao controle, podendo-se observar o valor de $6,85 \times 10^6$ células/mL e biomassa seca de 426,4 mg/L no 19º dia de cultivo, ou seja, inferior ao obtido no controle. No 9º dia a biomassa alcançou o valor de 224,4 mg/L de cultura, sendo aproximadamente 1,34 vezes menor do que o controle nesse dia. A redução em 10 vezes da quantidade de fosfato disponível no meio afetou fisiologicamente a célula, o que foi refletido na redução do crescimento celular e conseqüentemente na biomassa. O rendimento máximo obtido foi de 30,0 e apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao valor calculado para o controle (Tabela 5). A fase exponencial ocorreu entre os dias 1 e 5 de cultivo, com uma taxa de crescimento muito próxima da apresentada no controle, no valor de 0,27 (Tabela 5). Portanto ao compararmos com o controle, a velocidade de crescimento durante a fase exponencial não apresentou diferença significativa, mesmo quando com a redução da fonte de fósforo no meio de cultura (Tabela 5 e Figura 10). Entretanto, a cultura se manteve por menor tempo na fase exponencial

resultando numa menor produção de biomassa. Sabendo-se que a condição P10 é de limitação nutricional, já era esperada uma redução do crescimento celular e biomassa quando comparada com o controle. Entretanto, a ordem de grandeza dessa diminuição era desconhecida. Em relação ao controle, podemos observar que a limitação P10 teve influência no número de células/biomassa a partir do final da fase exponencial, porém não foi suficiente para afetar a velocidade de crescimento das células (taxa de crescimento).

Na condição de cultivo P50, ao contrário do ocorrido nas outras condições, o valor máximo atingido para o número de células não foi no último dia de experimento e sim no 7º dia com $3,92 \times 10^6$ células/mL. No 19º dia os valores obtidos foram $3,54 \times 10^6$ células/mL e 325,2 mg/L de biomassa seca. No momento intermediário do estudo, o 9º dia, a biomassa seca alcançou o valor de 216,0 mg/L de cultura, sendo aproximadamente 1,39 vezes menor do que o controle. Portanto, bastante próxima da condição P10. Podemos dizer que nesse momento do cultivo (9º dia), entre as condições P50 e P10 não existiu uma alteração significativa na redução da biomassa produzida em comparação com o controle. Cabe enfatizar que, as biomassas da condição P10 e P50 no 9º dia de cultivo apresentaram valores muito semelhantes. A partir do 7º dia, a curva de crescimento começou a declinar, isto é, ocorreu morte celular, mostrando o efeito da limitação do fósforo (redução em 50 vezes) na fisiologia das células. Goldberg & Cohen's (2006), estudaram a microalga de água doce *Monodus subterraneus* em diferentes condições de cultivo com decrescentes concentrações de fosfato (175, 52,5 e 17,5 μM), e também observaram o comportamento de queda da densidade celular. Li Xin *et al.* (2010), cultivaram uma Chlorophyceae de água doce (*Scenedesmus sp.*) em meios com diferentes

concentrações de fósforo e observaram o mesmo comportamento de diminuição contínua do crescimento celular a medida que a concentração do fósforo total inicial era reduzida.

Na condição P50 de nosso estudo (4,54 μM), o rendimento máximo foi de 17,2, com diferença significativa ($p < 0,01$) apenas em relação ao controle (Tabela 5). A fase exponencial ocorreu entre os dias 1 e 5 de cultivo com a taxa de crescimento no valor de 0,33 (Tabela 5). Na presente condição, apesar do maior estresse sofrido pelas células, a velocidade de crescimento durante a fase exponencial foi a mais alta entre os tratamentos apresentando diferença significativa entre o controle e a condição P10 (Tabela 5 e Figura 10). O efeito da taxa de crescimento foi refletido nos valores de biomassa, no 5^a dia a biomassa seca de P50 foi maior que P10, já que a fase exponencial de P50 e P10 teve o mesmo intervalo de tempo (1-5 dias). Adicionalmente a esse fato, apesar da morte celular ter iniciado a partir do 7^o dia de cultivo, a biomassa seca da condição P50 continuou a crescer até o 19^o dia de cultivo, ou seja, as células remanescentes tornaram-se mais densas. Provavelmente, ocorreu o acúmulo de algum componente intracelular e, tratando-se de limitação nutricional, acreditamos que foram os lipídeos e/ou carboidratos que tenham tido sua síntese intensificada.

O fósforo é componente elementar dos ácidos nucleicos, e participam da síntese de proteínas (biomassa), e podem afetar o equilíbrio do ADP e ATP, interferindo em diversas reações energéticas na célula (PARK *et al.*, 2011). Por isso, o fósforo é um requerimento essencial para a vida de qualquer organismo (REYNOLDS, 2006). Como descrito anteriormente, o conteúdo de fósforo das microalgas é de aproximadamente 1% de sua biomassa, podendo chegar a

0,03% da biomassa seca em algumas espécies. Entretanto, existem fortes evidências que a disponibilidade do fósforo apenas limitaria a atividade e crescimento das microalgas quando a concentração desse nutriente está abaixo do limite de absorção do mesmo (entre 5 a 1 $\mu\text{g/L}$), o que normalmente fica abaixo da detecção analítica convencional (REYNOLDS, 2006).

Entretanto, em condições de limitação de fósforo no meio, as microalgas sintetizam fosfatases específicas que auxiliam na internalização do P deficiente para seu armazenamento. Logo, a capacidade desses organismos em estocar o fósforo intracelularmente possibilita que a quantidade de fósforo total em relação a biomassa seca alcance até $\geq 3\%$ (REYNOLDS, 2006). Contudo, em condições críticas de limitação de fósforo ($< 0,1 \mu\text{M P}$) a capacidade de armazenamento intracelular fica prejudicada devido às ínfimas quantidades do nutriente disponível.

As afirmações acima explicariam o fato das células da condição P10, no presente estudo, terem apresentado a capacidade de manter seu crescimento celular até o 19º dia, mesmo em condições de deficiência desse nutriente no meio de cultura. Contudo, na condição P50, a deficiência de 50 vezes não permitiu que o crescimento fosse mantido até o 19º dia, verificando-se o declínio a partir do 7º dia de cultivo, ou seja, o dano fisiológico foi intenso nesse tratamento. A maquinaria de síntese de proteínas foi afetada pela intensa limitação existente no meio de cultura. Portanto, a limitação de fósforo afetou diretamente e de forma proporcional o crescimento celular, refletido pela redução de biomassa nos tratamentos P10 e P50, quando comparados com a condição controle. Conseqüentemente, a condição P50 apresentou o menor conteúdo de biomassa em relação ao controle.

4.2.2 Clorofila-a

Ao compararmos o gráfico de número de células/mL (Figura 10) com o de clorofila-a $\mu\text{g/L}$ (Figura 11) observamos uma coerência, onde o controle apresentou um maior número de células e conseqüentemente maior concentração de clorofila por litro, seguido das condições P10 e P50. Entretanto, apesar das células continuarem se multiplicando na condição controle, após o 11º dia, a concentração deste pigmento começou a declinar. Na condição P10 a curva de clorofila-a parece estagnar a partir do 9º dia e em P50 o declínio se inicia no 9º dia de cultivo. O valor máximo obtido de clorofila-a em $\mu\text{g/L}$ no controle foi no 11º dia com o valor de 11,01 $\mu\text{g/L}$. Na condição P10 o maior valor foi no 13º dia com o valor de 5,32 $\mu\text{g/L}$ e para P50 foi no 9º dia com valor de 2,97 $\mu\text{g/L}$ (Figura 11). Goldberg & Cohen's (2006), também correlacionaram a deficiência de fósforo no meio de cultivo com uma síntese de clorofila-a severamente afetada.

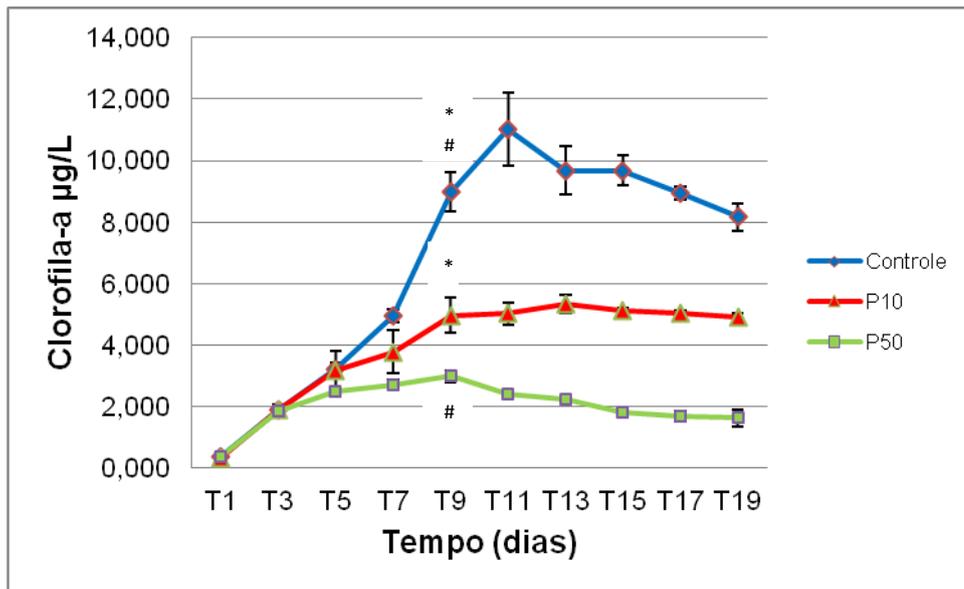


Figura 11 – Variação da concentração de clorofila-a ($\mu\text{g/L}$) em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística no 9º dia entre controle e P10 ($*p<0,01$) e controle e P50 ($\#p<0,01$). (* e # = diferença significativa).

Os dados de concentração de clorofila-a por células nos permitem avaliar a influência da limitação de fósforo na produção desse pigmento (Figura 12). A produção de clorofila por célula na condição controle apresentou-se aumentando até o 9º dia, seguindo de uma queda brusca (Figura 12). Na condição P10 a produção de clorofila-a se manteve em crescimento até o 7º dia de cultivo, seguida de um declínio contínuo a partir desse dia. Na condição P50 a produção de clorofila por célula cresceu apenas até o 3º dia de cultivo mantendo-se posteriormente em leve queda.

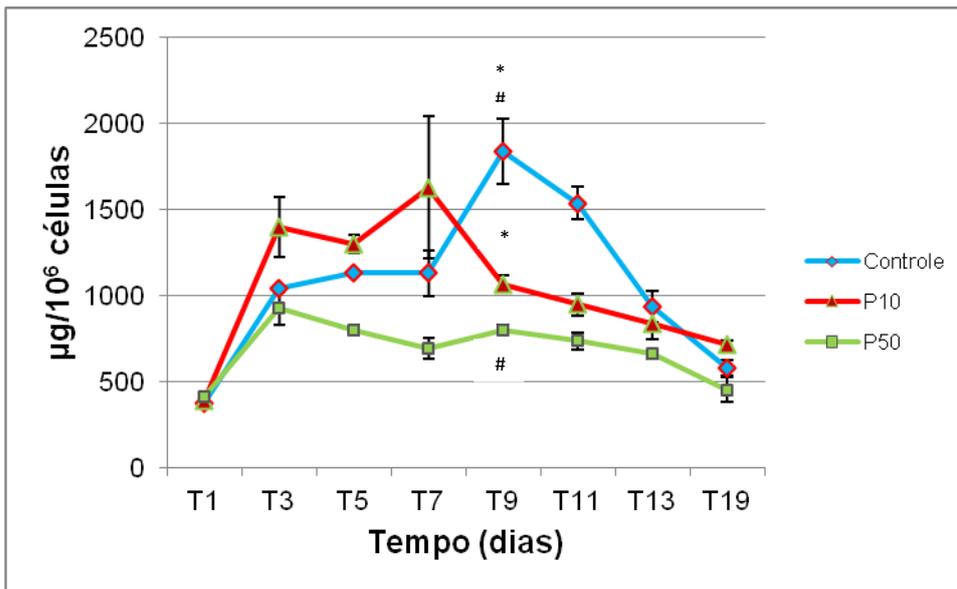


Figura 12 – Variação da concentração de clorofila-a ($\mu\text{g}/10^6$ células) em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística no 9º dia entre controle e P10 (* $p<0,01$) e controle e P50 (# $p<0,01$). (* e # = diferença significativa).

A variação da concentração de clorofila-a por células apresentou-se diretamente relacionada com as fases de crescimento dos cultivos, indicando uma correlação entre a limitação de fósforo, o estado fisiológico das células e a síntese desse pigmento. O fósforo é um dos nutrientes essenciais para a via fotossintética e sua exaustão afeta diretamente a fotossíntese. De acordo com o estudo desenvolvido por Park et al. 2011, a deficiência de fósforo afeta de modo negativo genes relacionados com as vias metabólicas básicas da célula, incluindo a biosíntese de clorofila-a. Além disso, foi comprovado que, particularmente os genes envolvidos com as reações de fotossíntese seriam mais afetados do que outros genes quando em limitação de fósforo. Portanto, esses autores observaram redução no conteúdo de clorofila-a em células mantidas sob redução de fósforo. A clorofila-a é um pigmento essencial para a captura da luz e conseqüentemente para o crescimento celular. Li et al. (2008)

observaram, em *Neochloris oleoabundans*, que em condições de limitação de nitrogênio a concentração de clorofila-a decresceu bastante e de acordo com esses autores, isso ocorreu provavelmente devido a utilização do N contido nesse pigmento para a multiplicação celular. De acordo com os dados já obtidos na literatura é provável que em nosso estudo, esse pigmento também tenha tido sua síntese reduzida devido à deficiência de fósforo. Observando nossos resultados, vimos que o controle mantém seu crescimento até o 19º, porém o conteúdo de clorofila-a decai a partir do 9º dia de cultivo (Figuras 10 e 12). No caso dos tratamentos P10 e P50 observamos a queda da concentração do pigmento por células a partir do 7º e 3º dias e o crescimento celular até os dias 19º e 7º, respectivamente. Podemos concluir que a condição de estresse por limitação de fósforo comprometeu a síntese de clorofila-a de forma dependente do grau de deficiência desse nutriente. Na condição P10 a redução do fósforo ainda permitiu que a célula continuasse desprendendo energia para a divisão celular, entretanto reduziu a síntese de clorofila-a. Na condição P50 a deficiência foi muito grande para que a célula se mantivesse em crescimento e a síntese de clorofila-a foi bastante afetada. Dessa forma, acreditamos que a energia para a síntese desse pigmento tenha sido desviada para outra via metabólica, como a síntese de lipídeos de reserva.

Na Figura 13 é possível observar a coloração mais amarelada dos meios de cultivo com redução de fósforo quando comparados com o controle no último dia de experimento (19º dia). Ilustrando a redução da síntese desse pigmento proporcional às condições de exaustão de fósforo, onde a condição P50 apresentou-se mais amarelada em relação ao P10 e controle.

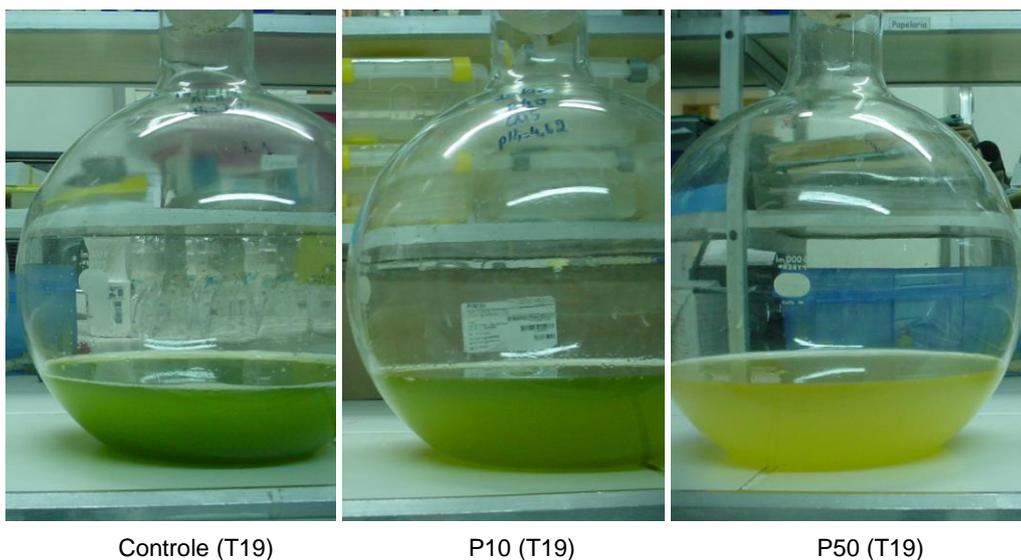


Figura 13 – Fotos dos frascos de culturas no 19^o dia de experimento dos cultivos Controle, P10 e P50 (da esquerda para direita).

4.2.3 Carboidratos intra e extracelulares

A variação da concentração de carboidratos intracelulares em $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14) apresentou um perfil semelhante até o 7^o dia de cultivo, para os diferentes tratamentos. A partir do 9^o dia, o conteúdo de carboidratos intracelulares na condição controle manteve-se aumentando de forma mais acentuada em relação aos demais, porém só observou-se diferença significativa entre o controle e P10 ($p < 0,05$) e controle e P50 ($p < 0,01$), a partir do 13^o dia. Este aumento se manteve até o 15^o dia, onde alcançou seu valor máximo em $239,5 \mu\text{g/mL}$ (condição controle). Ao compararmos as condições com limitação de fósforo (P10 e P50) notamos que só existe uma diferença significativa entre suas curvas no 13^o dia de cultivo, onde o P10 se destaca e alcança o valor de $137,2 \mu\text{g/mL}$. A curva da condição P50 só apresentou

aumento entre o 3º e 11º dias, onde obteve seu valor máximo de 96,3 µg/mL. Já na condição P10, este aumento se deu do 3º ao 13º dia.

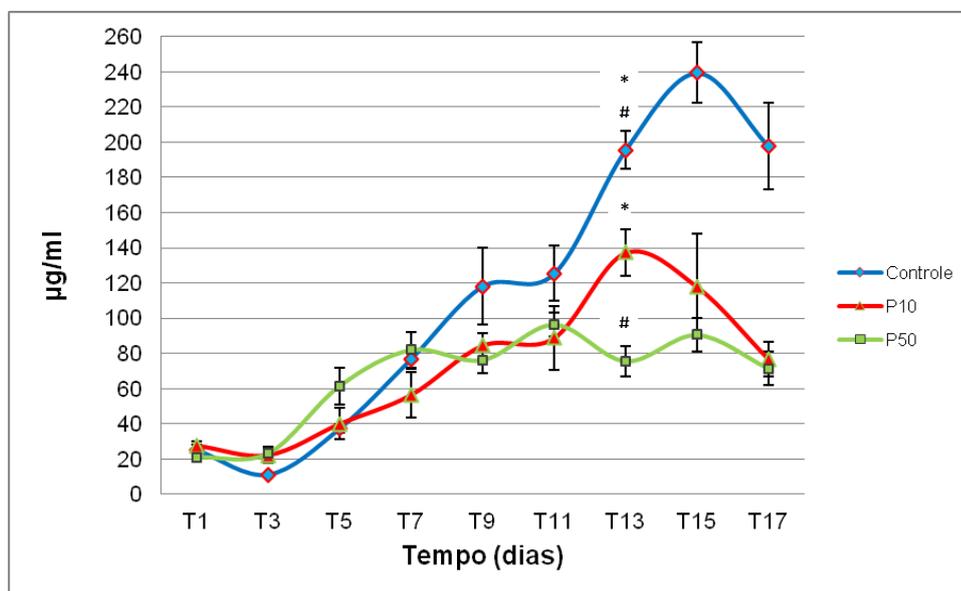


Figura 14 – Variação da concentração de carboidratos intracelulares (µg/mL) em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média (n=3) ± erro padrão. Diferença estatística no 13º dia entre o controle e P10 (*p<0,05) e controle e P50 (#p<0,01). (* e # = diferença significativa).

A variação da concentração de carboidratos extracelulares em µg/mL (Figura 15) se manteve equivalente nos três tratamentos até o 7º dia, ocorrendo uma leve discrepância entre as curvas apenas no 9º dia, porém sem diferença significativa. Ou seja, a limitação do macronutriente em questão, nas condições experimentadas, não alterou na quantidade de carboidratos excretada pelas células estudadas. Além disso, é evidente que a quantidade no meio exterior é muito menor do que a sintetizada intracelularmente, chegando a uma média de aproximadamente 37 vezes menor, quando analisamos o controle no 9º dia.

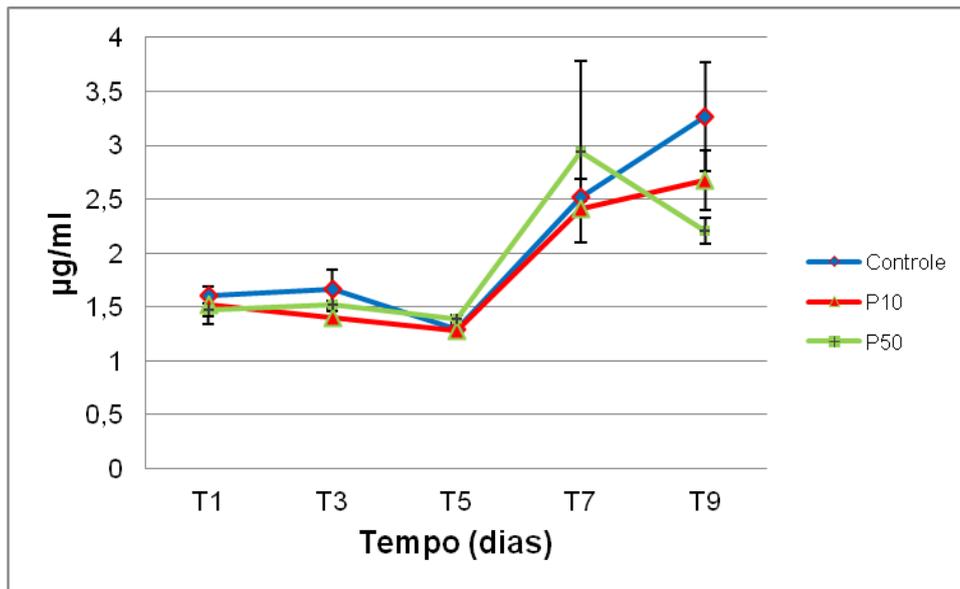


Figura 15 – Variação da concentração de carboidratos extracelulares ($\mu\text{g/mL}$) em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão.

Analisando as curvas dos carboidratos intracelulares por células (Figura 16) notamos que não há grandes diferenças entre os tratamentos. As condições P10 e P50 foram as que apresentaram diferença significativa entre si no 11º dia de cultivo ($p<0,05$), onde P50 alcançou o valor de $29,4 \mu\text{g}/10^6$ células. Portanto, apesar do gráfico de carboidratos intracelulares em $\mu\text{g/mL}$ ter apresentado o controle com o maior conteúdo de carboidratos no 13º dia, o mesmo não se observou quando os dados por células foram analisados, onde as três condições se comportaram de modo semelhante nesse dia. A condição P50 apresentou o maior conteúdo por célula no 11º dia de cultivo. Essa observação se deve ao fato que, o controle tem o maior número de células durante todo o experimento e por isso a quantificação de carboidratos intracelulares por volume (mL) de cultura se mostra acima do P10 e P50. Entretanto, as células com a maior limitação de fósforo acumularam mais

carboidratos, o que é demonstrado por P50 no 11^o dia de cultivo, com um aumento significativo. Embora sem comprovação estatística, verifica-se que a condição controle manteve-se com menores concentrações de carboidratos intracelulares durante a sua fase exponencial de crescimento, o que era esperado. Várias pesquisas já demonstraram o aumento dos carboidratos de estoque, à custa do declínio de proteínas/biomassa, em condições de limitação nutricional (Børshheim *et al.*, 2005; Jacob-Lopes *et al.*, 2007).

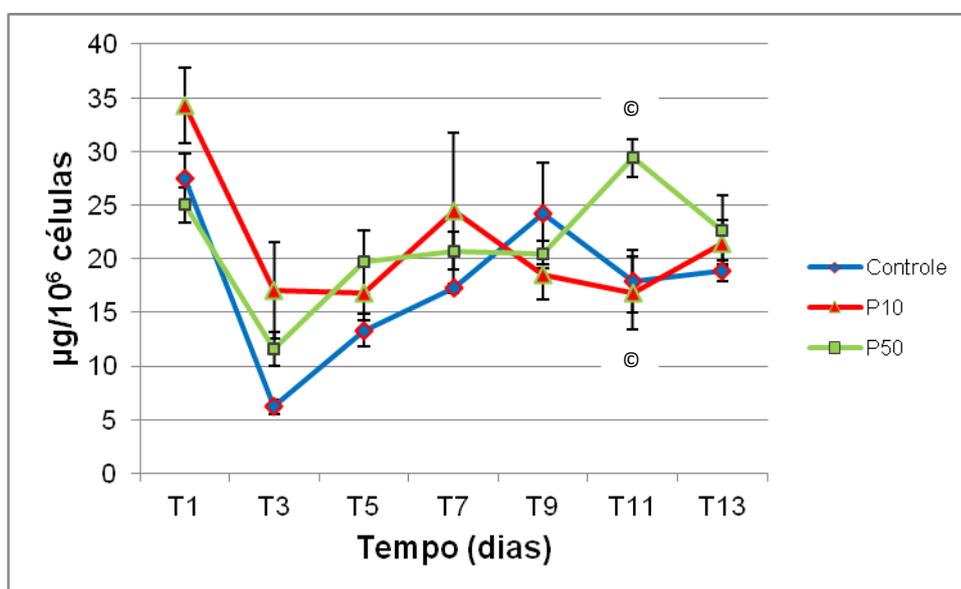


Figura 16 – Variação da concentração de carboidratos intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística no 11^o dia entre P10 e P50 ($\text{©}p<0,05$). (© = diferença significativa).

4.2.4 Nutrientes

Os macronutrientes analisados no presente estudo foram o fosfato e o nitrato do meio extracelular. A quantificação do fosfato, em $\mu\text{g}/\text{L}$, ao longo do desenvolvimento dos cultivos, pode ser visualizada na Figura 17. O controle,

P10 e P50 no 1º dia de cultivo apresentaram valores diferentes dos calculados para o experimento com limitação de fosfato. Os valores de 18.104 µg/L, 1.212 µg/L e 912 µg/L foram obtidos respectivamente para as condições controle, P10 e P50. Entretanto, os valores respectivos calculados para o início do estudo foram 21.565 µg/L, 2.156,5 µg/L e 431,3 µg/L.

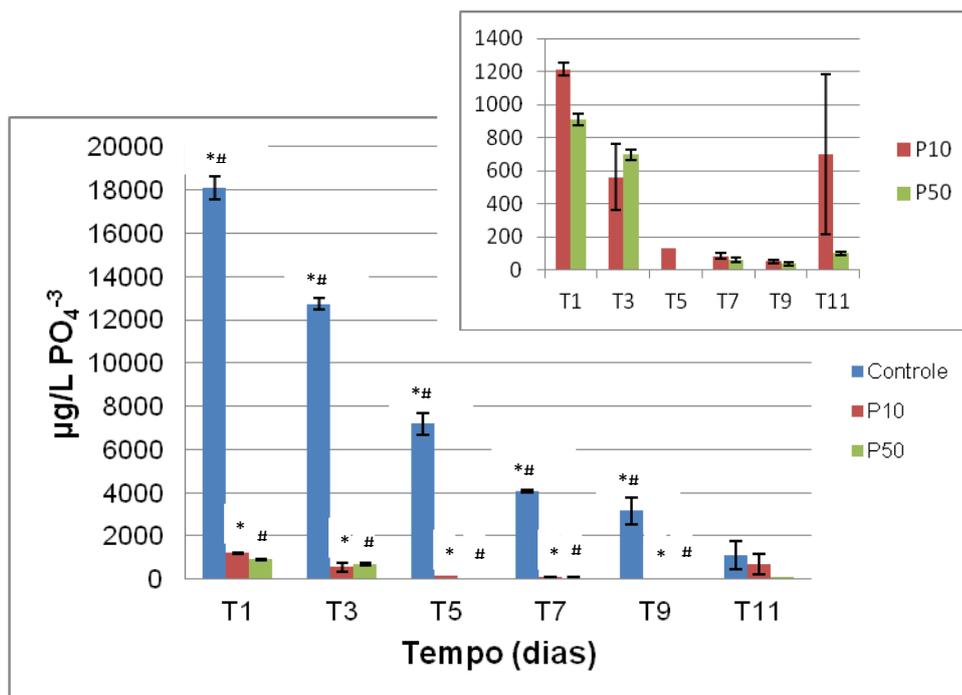


Figura 17 – Variação da concentração de fosfato no meio de cultivo (µg/L) durante o desenvolvimento de culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média (n=3) ± erro padrão. Diferença estatística para todos os dias com exceção do 11º dia, entre o controle e P10 (*p<0,01) e controle e P50 (#p<0,01). (* e # = diferença significativa). O gráfico menor na parte superior à direita, se refere aos dados de P10 e P50 para melhor visualização da escala do eixo y.

Em todas as três condições estudadas podemos observar a absorção contínua do fosfato presente no meio de cultura através da queda progressiva da concentração desse nutriente (Figura 17). As amostras foram analisadas e quantificadas até o 11º dia de cultivo, devido o fato que nos dias seguintes

essas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação do método utilizado (6 µg/L). Apesar do gráfico desta Figura expor de forma mais clara os dados do controle, podemos afirmar que ocorreu uma queda contínua na quantidade do nutriente analisado nas 2 condições de limitação de fósforo até o 9º dia e para o controle até o 11º dia. Entretanto, no último dia de análise, os tratamentos P10 e P50 apresentaram um aumento na quantidade do macronutriente em relação ao 9º dia, provavelmente decorrente da liberação desse nutriente para o meio a partir da morte celular. Ao compararmos o controle com os tratamentos de limitação de fósforo a diferença significativa ocorreu em todos os tempos amostrais ($p < 0,01$ entre controle e P10; controle e P50) com exceção do 11º dia. Não houve diferença significativa entre os tratamentos P10 e P50 em nenhum dia amostrado para esta análise.

O mesmo comportamento em relação aos decrescentes valores de fosfato é observado na Figura 18, onde o fosfato é expresso em relação ao número de células. Da mesma forma que na relação por litro de cultura, o nutriente apresenta um leve aumento no 11º dia de amostragem para P10 e P50. As diferenças significativas entre os tratamentos seguiram o mesmo padrão da quantificação por litro de cultura, não ocorrendo diferença entre P10 e P50. Atribuindo à quantificação inicial de fosfato de cada condição como 100% podemos aferir que no 9º dia de cultivo o controle apresentava 3,2% da concentração inicial analisada, P10 e P50 apresentavam 0,7% e 0,9%, respectivamente, da quantidade inicial. Portanto, podemos afirmar que a porcentagem da absorção de fósforo foi semelhante nos tratamentos com limitação desse nutriente até o 9º dia de cultivo. Uma redução teórica em 50 vezes na concentração inicial do fosfato não estimulou uma absorção maior do

que a redução de 10 vezes. A quantificação inicial da concentração do fosfato, no controle, P10 e P50 foram 18.104 $\mu\text{g/L}$, 1.212 $\mu\text{g/L}$ e 912 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Esse fato está relacionado com o crescimento celular, mostrando um potencial dano fisiológico sofrido pelas células no meio de cultura P50.

Apesar da concentração de fosfato por células chegar perto de zero no 11º dia, o crescimento celular ainda foi observado nas condições controle e P10 após esse período. Este fato pode indicar que, o fosfato intracelular de reserva foi suficiente para a manutenção do crescimento em condições de exaustão.

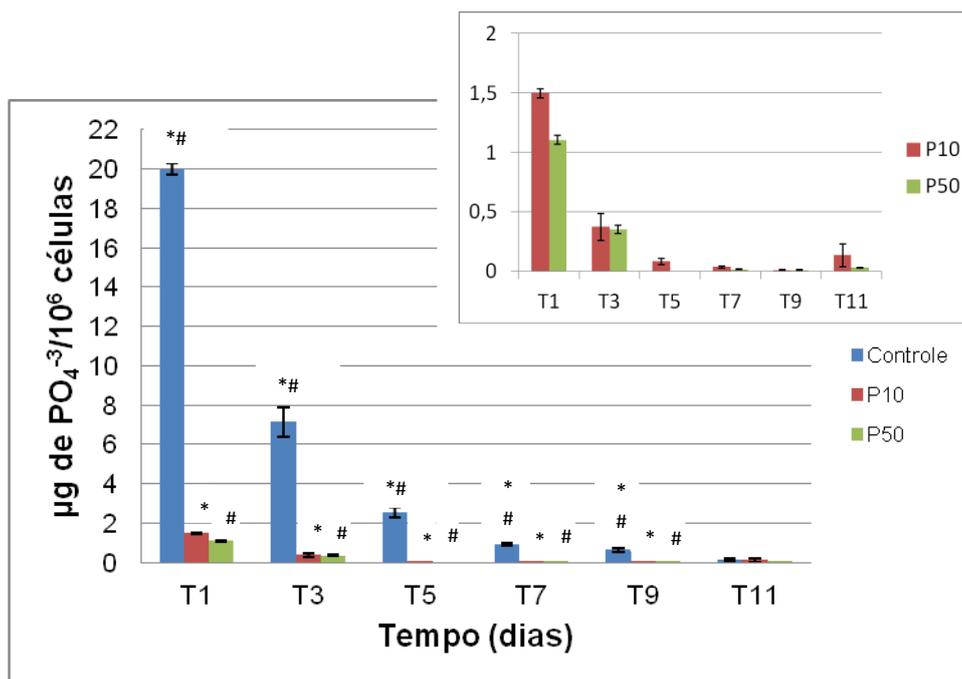


Figura 18 – Variação da concentração de fosfato no meio de cultivo ($\mu\text{g}/10^6$ células) durante o desenvolvimento de culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística para todos os dias com exceção do 11º dia, entre o controle e P10 (* $p<0,01$) e controle e P50 (# $p<0,01$). (* e # = diferença significativa). O gráfico menor na parte superior à direita, se refere aos dados de P10 e P50 para melhor visualização da escala do eixo y.

Na Figura 19 podemos observar a variação da concentração de nitrato por litro de cultura. Entre o 1º e o 7º dia de experimento, o nitrato decresce de forma semelhante entre os tratamentos, sem diferença significativa entre eles. Apenas no 9º e 11º dia o controle apresenta uma queda mais acentuada, em relação aos tratamentos de limitação nutricional, comprovada pela diferença significativa em relação aos mesmos ($p < 0,05$, entre controle e P10 no 9º e 11º dia); ($p < 0,01$ entre controle e P50 no 9º e 11º dia). Entre as condições P10 e P50 não existiu diferença significativa em nenhum dia analisado. A absorção do nitrogênio foi obviamente afetada pela deficiência de fósforo. De modo que, a limitação de fósforo nos tratamentos P10 e P50 parecem influenciar a eficiência da absorção do nitrogênio do meio de cultivo quando em longos períodos de cultivo (9 e 11 dias). Essa redução na absorção do nitrogênio em condições de limitação de fósforo, deve provavelmente ter ocorrido como consequência da redução da síntese protéica nessa condição, que resultou em uma menor taxa de divisão celular.

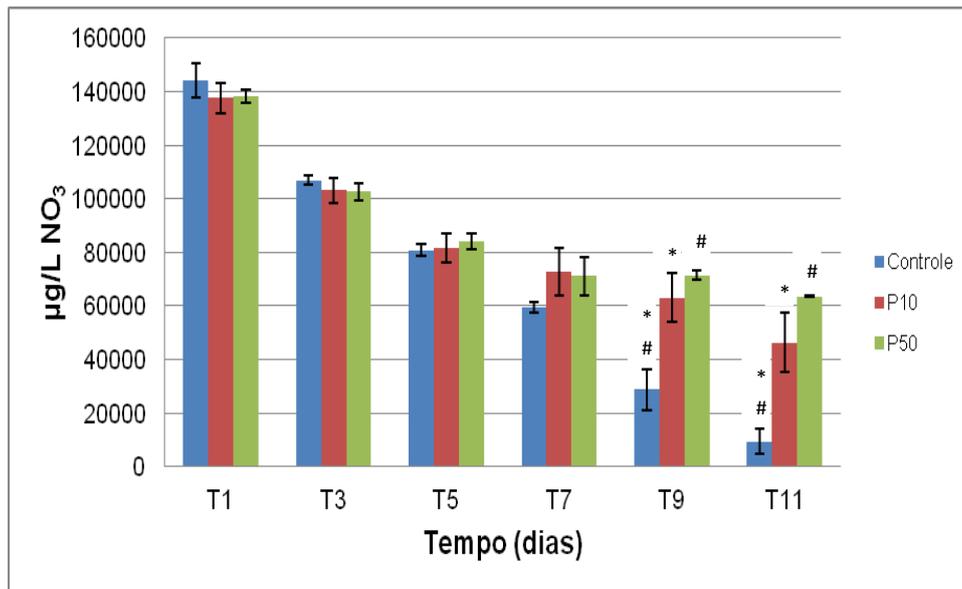


Figura 19 – Variação da concentração de nitrato no meio de cultivo ($\mu\text{g/L}$) durante o desenvolvimento de culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística no 9º e 11º dias entre controle e P10 (* $p<0,05$) e controle e P50 (# $p<0,01$). (* e # = diferença significativa).

Analisando a variação da concentração de nitrato extracelular por número de células (Figura 20) identificamos que o decréscimo ocorre para as três condições até o 5º dia sem diferença significativa entre as mesmas nesse período. Na condição controle, a partir do 7º dia de cultivo, observou-se que o esgotamento do nitrato no meio foi contínuo, enquanto que nas condições P10 e P50 passou-se a observar uma redução na absorção desse nutriente. Comparando as condições de limitação de fósforo, observamos que na condição P50 não ocorreu absorção entre o 9º e 11º dia de cultivo e na condição P10 a absorção ocorreu de forma muito discreta entre os dias mencionados. Li Xin *et al.* (2010), observaram a absorção de fosfato e nitrato no cultivo de *Scenedesmus sp.* e, assim como o apresentado aqui, reportaram a absorção do nitrato como dependente da disponibilidade de fósforo no meio.

Esses autores observaram que, em maiores concentrações iniciais de fósforo, as células apresentavam melhores eficiências de absorção do nitrato.

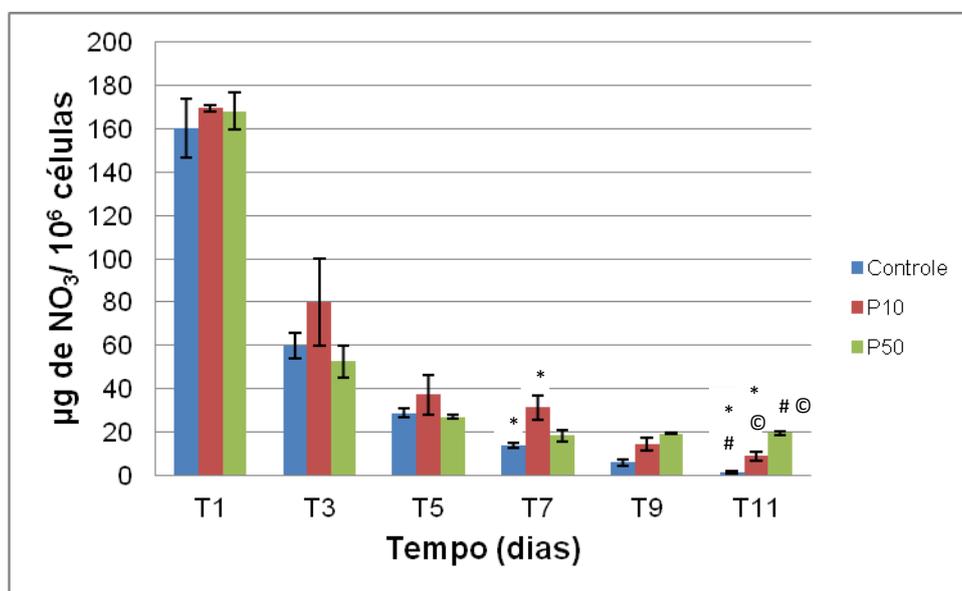


Figura 20 – Variação da concentração de nitrato no meio de cultivo ($\mu\text{g}/10^6$ células) durante o desenvolvimento de culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística no 7º dia entre controle e P10 (* $p<0,05$) e no 11º dia entre controle e P10 (# $p<0,01$), entre controle e P50 (# $p<0,01$) e P10 e P50 (© $p<0,05$). (*, # e ©= diferença significativa).

4.2.5 Lipídeos

O nome extrato bruto lipídico atribuído ao conteúdo de lipídeos, deve-se ao fato que o processo de extração utilizado leva a uma extração não específica dos lipídeos das microalgas. Portanto, todas as moléculas solúveis nos solventes orgânicos utilizados foram extraídas juntamente com a porção lipídica, inclusive o pigmento clorofila-a, como podemos observar na Figura 21. Por isso, faz-se necessária uma maior atenção em relação aos protocolos

utilizados atualmente na literatura com a finalidade de extrair lipídeos de microalgas. Normalmente os trabalhos nessa área referem-se a esse tipo de extrato como extrato lipídico e a partir daí fazem uma série de estimativas que certamente levam à super estimação do conteúdo real de lipídeos presente na composição das microalgas.

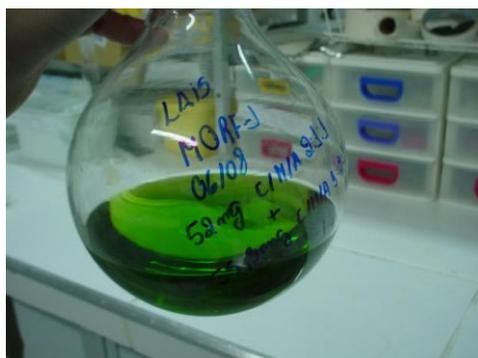


Figura 21 – Extrato bruto lipídico de microalgas após extração com solventes orgânicos (clorofórmio e metanol).

A síntese de lipídeos ocorreu ao longo de todo o experimento e em todas as condições (Figura 22), sendo verificado que aquela que apresentou os maiores valores percentuais (%) de extrato bruto lipídico/peso seco de biomassa foi a condição P50 desde o 5º dia de experimento. Apenas no 9º dia de experimento (fase estacionária) foram observadas diferenças significativas entre as três condições de cultivo. A condição P50 teve o maior valor chegando a 37% e P10 o segundo maior valor com 29,4% de lipídeos na biomassa seca. Os resultados apresentados corroboram com a hipótese que a limitação nutricional é um eficiente estímulo para o aumento do conteúdo lipídico por biomassa, fato já relatado por vários pesquisadores (Goldberg & Cohen's, 2006; Courchesne *et al.*, 2009; Li Xin *et al.*, 2010).

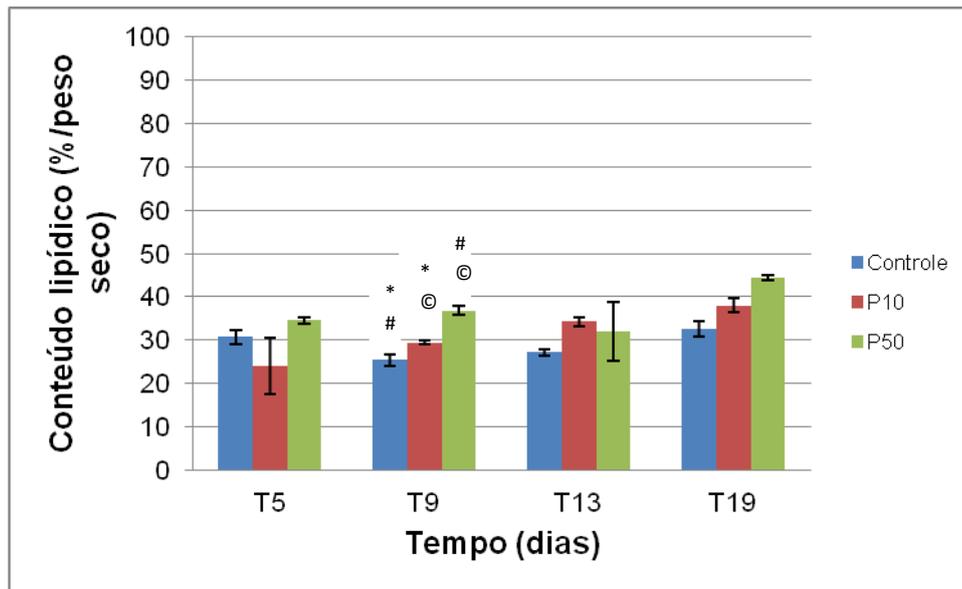


Figura 22 – Extrato bruto lipídico (%) obtida em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média (n=3) ± erro padrão. Diferença estatística no 9º dia entre controle e P10 (*p<0,05), controle e P50 (#p<0,01) e P10 e P50 (©p<0,01). (*, # e ©= diferença significativa).

O maior acúmulo lipídico de reserva na menor concentração inicial de fósforo deve-se provavelmente a rápida exaustão do nutriente ainda em baixa densidade celular. Nessa fase, a disponibilidade de luz no meio ainda era alta, permitindo que grande quantidade de energia chegasse às células individualmente. Entretanto, devido à deficiência nutricional, as células teriam a síntese de proteínas reduzida e a produção de energia seria utilizada para o acúmulo de lipídeos de reserva (Courchesne *et al.*, 2009).

Em todos os tratamentos testados, o máximo na síntese de lipídeos foi alcançado no 19º dia (fase estacionária), sendo estes 32,6%, 38% e 44,4% para controle, P10 e P50, respectivamente. Entretanto, ao observarmos a curva de crescimento de P10 e P50 notamos que o número de células de P50 começa a declinar a partir do 9º dia, enquanto que P10 continua a crescer

ainda no 19º dia, ou seja, apesar da condição P50 ter maior valor absoluto de extrato lipídico (%), a condição P10 após o 9º dia seria a mais promissora em produtividade lipídica (produção por unidade de biomassa) devido a maior produção de biomassa. Li Xin *et al.*(2010), observaram o mesmo comportamento no experimento de limitação de fósforo, onde o alto conteúdo lipídico é inversamente proporcional a baixa produtividade lipídica, ou seja, maior conteúdo lipídico porém menor biomassa/número de células.

Ao compararmos o percentual lipídico da condição P10 com P50, notamos uma diferença significativa, onde P50 é 25% e 16% maior do que P10 no 9º dia ($p < 0,01$) e 19º dia ($p < 0,05$), respectivamente.

Nos dados apresentados como extrato bruto de lipídeos/ 10^5 células (Figura 23), os maiores valores observados também ocorrem na condição P50, com o máximo de 2,76 e 4,08 μg de extrato bruto/ 10^5 células no 13º dia e 19º dia, respectivamente. Nesse caso, o valor obtido para P50 é 70% e 0,7% maior do que o valor obtido para P10, no 13º e 9º dia, respectivamente. Comparando os valores absolutos de células por volume (mL) de meio de cultura (Figura 10) com a quantidade de lipídios produzida (Figura 22), notamos que não existe uma proporcionalidade entre o aumento do número de células e o aumento na síntese dos lipídios.

Podemos concluir que a regra geral sobre o comportamento fisiológico de microalgas em situações de estresse, como citado anteriormente, é representado nesse experimento, onde o tratamento com a menor concentração de fósforo foi o que apresentou maior acúmulo de reserva energética lipídica. Isso está relacionado com o estado fisiológico das células

nas condições P50 e P10, de forma que as células apresentam maior teor lipídico na situação com menor concentração de fósforo. Adicionalmente, sabe-se que condições de limitação de fósforo levam a uma regulação gênica positiva da via biosintética de lipídeos de reserva da célula (PARK *et al.*, 2011). Fato este, que corrobora com o comportamento apresentado pelas células no presente estudo.

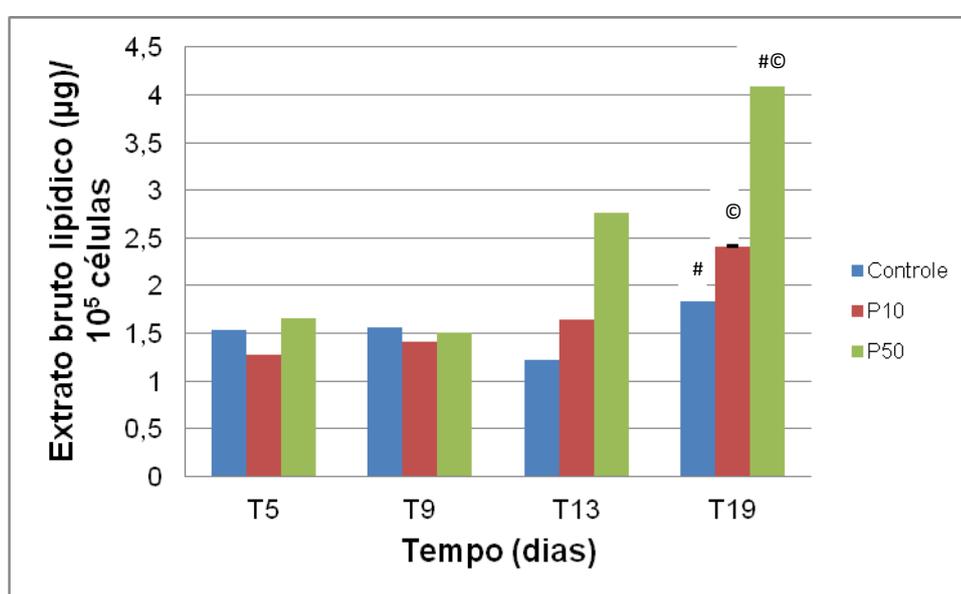


Figura 23 – Extrato bruto lipídico ($\mu\text{g}/10^5$ células) obtida em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm erro padrão. Diferença estatística no 19º dia entre controle e P50 (# $p<0,01$) e P10 e P50 (© $p<0,01$). (# e ©= diferença significativa).

4.2.6 Ésteres de ácidos graxos (“FAME’s”)

A Figura 24 se refere à porcentagem dos metil ésteres de ácidos graxos, calculada após derivatização dos ácidos graxos do extrato bruto em metil ésteres (“FAME’s”) e determinação de sua massa. Observando a Figura 24, notamos que a barra de erro padrão das três condições testadas se

apresentam muito grandes, isso ocorreu devido a falta de eficiência durante o processo de derivatização utilizado. De acordo com o teste estatístico (ANOVA multivariada) não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos dias amostrados para a análise dos “FAME’s”. Este resultado deve-se a ineficiência da metodologia aplicada para o processo de derivatização nas amostras estudadas, o que levou a uma grande variação entre as réplicas e conseqüentemente um grande valor do erro padrão. Como já mencionado, a metodologia utilizada foi a de JOSEPH & ACKMAN (1992), que usualmente é utilizada para amostras de 5 g de óleo de vegetais, sendo adaptada nesse estudo para uma quantidade bem inferior, em média de 50 mg de óleo de microalgas, o que provavelmente resultou na ineficiência observada. Na Tabela 6 podemos observar a quantificação em $\mu\text{g/mL}$ de cada um dos ácidos graxos de interesse (“FAME’s”), apresentando grande variação entre as réplicas, fato ocorrido devido à ineficiência da metodologia aplicada. Por esta razão, não foi possível realizar a quantificação dos ácidos graxos de interesse presentes, sendo possível apenas confirmar a detecção dos mesmos, que será descrita no item 4.2.7. Uma alternativa frente ao problema enfrentado seria o desenvolvimento de nova metodologia, para uma melhor aplicação, dado a matriz utilizada (microalgas) e a pequena quantidade de biomassa analisada quando comparada com as matrizes de vegetais superiores.

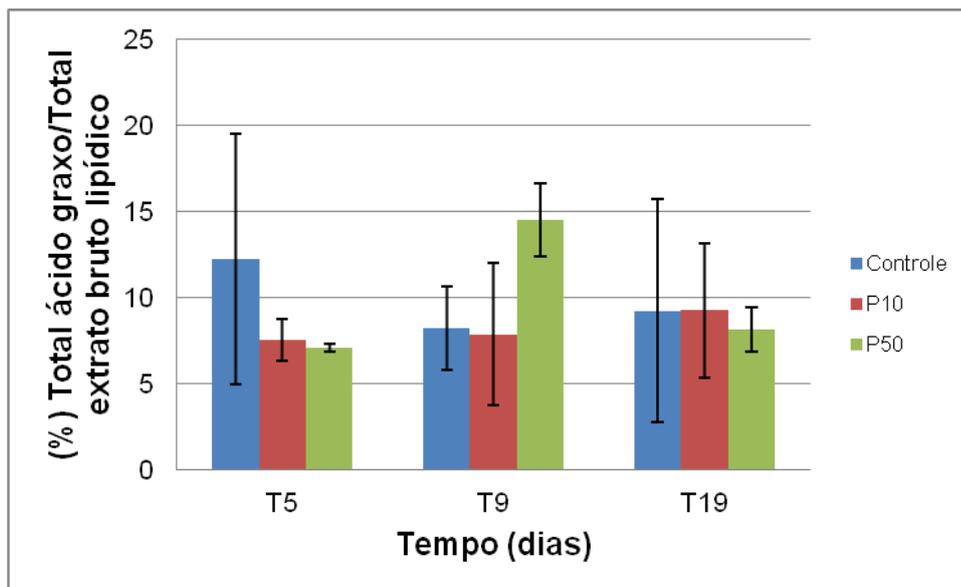


Figura 24 – Total de “FAME’s” de ácidos graxos (%) por total de extrato bruto lipídico obtida em culturas de ANRF-01, nas diferentes concentrações de fósforo (controle, P10 e P50). Os resultados representam a média (n=3) ± erro padrão.

Tabela 6 – Quantificação em µg/mL dos “FAME’s” de interesse por cromatografia gasosa presentes nas amostras de ANRF-01 após derivatização.

Padrões de ácidos graxos	Controle									P10									P50								
	T5			T9			T19			T5			T9			T19			T5			T9			T19		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
C 16:0	90,0	nd	0,05	nd	6,9	13,9	nd	127,2	6,7	nd	nd	1,0	nd	504,1	238,2	72,8	264,3	3,4	90,6	87,8	305,7	488,6	nd	49,2	45,5	34,8	
C 18:1	21,2	nd	nd	nd	1,5	7,4	nd	6,0	3,5	nd	0,1	nd	29,2	0,03	1,3	1,8	nd	2,7	16,8	212,5	16,8	nd	nd	2,5	2,5	2,0	
C 18:2	13,3	0,1	nd	114,1	2,5	0,07	nd	17,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	47,5	15,1	nd	nd	27,4	230,5	90,7	nd	175,4	0,3	nd	nd	
C 18:0	6,1	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	17,8	0,09	nd	0,05	nd	36,8	19,2	6,6	23,6	nd	3,8	4,5	23,2	35,0	nd	4,6	3,4	0,3	nd	
C 12:0	nd	nd	nd	nd	5,3	0,05	nd	nd	8,8	0,10	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,06	nd	nd	0,1	0,03	
C 17:0	nd	nd	nd	nd	0,8	1,9	nd	0,9	nd	nd	0,03	nd	0,82	1,1	0,7	1,1	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	1,1	nd	1,7	
C 11:0	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	0,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,05	0,1	nd	nd	nd	nd	
C 20:1	nd	nd	nd	nd	nd	0,008	nd	0,02	0,03	0,01	nd	nd	0,02	9,14	0,04	0,02	nd	nd	nd	nd	1,2	7,5	nd	0,02	nd	nd	

Legenda: 16:0 – Ácido palmítico; 18:1 – Ácido oléico; 18:2 – Ácido linoléico; 18:0 – Ácido esteárico; 12:0 – Ácido duodecaenóico; 17:0 – Ácido heptadecaenóico; 11:0 – Ácido undecaenóico; 20:1 – Ácido cis-eicosaenóico.

4.2.7 Detecção dos “FAME’s” de interesse por Cromatografia Gasosa

Apesar de toda porção ácido graxo ter sofrido o protocolo de derivatização formando metil ésteres (“FAME’s”) apenas foram identificadas 8 moléculas dessa classe (citadas no item 3.14). Outras moléculas também de interesse para a produção de biodiesel podem estar presentes sem terem sido detectadas pela cromatografia gasosa.

Na Tabela 7 estão representadas a ocorrência de cada uma das 8 moléculas detectadas por cromatografia gasosa. Os ésteres de interesse foram detectados em sua minoria, em todas as condições estudadas, no 5º dia de cultivo. A condição controle e P10 apresentaram um perfil mais variado já no último dia de cultivo (19º dia). É notável que o perfil de metil ésteres de interesse, na condição P50 com 9 dias de cultivo e na condição controle com 19 dias de cultivo, foram aquelas com uma maior variedade de ácidos graxos detectada, entre os três tratamentos testados. Portanto, a redução de fósforo em 50 vezes parece ter afetado o perfil de ácidos graxos, em relação ao 9º dia de cultivo. Uma possível explicação para a presença do ácido palmítico em todas as condições e dias analisados seria o tipo de metodologia de extração empregado para o estudo dos lipídeos. Pesquisadores já reportaram que diferentes metodologias de extração levam a um perfil variado de ácidos graxos (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2011). A utilização da combinação dos solventes orgânicos clorofórmio e metanol favorece a extração do ácido palmítico. No estudo de Mendes *et al.*, (2006), diferentes protocolos de extração foram testados e o perfil de ácidos graxos para a cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) máxima*, onde a utilização do protocolo de extração (BLIGH & DYER, 1959)

com clorofórmio e metanol apresentou maior afinidade pelos ácidos palmíticos e linoléicos em comparação com outras metodologias aplicadas, como acetona; metanol ou hexano.

Goldberg & Cohen's (2006) observaram que a limitação nutricional de fósforo afetou diretamente o perfil de ácidos graxos produzidos para a microalga *Monodus subterraneus*.

Tabela 7 – “FAME's” de interesse detectados para cada uma das condições estudadas (Controle, P10 e P50) nos tempos amostras do 5º, 9º e 19º dias de cultivo (T5, T9 e T11).

"FAME's"		AP	AO	AL	AE	AD	MHD	AU	CIS-EICO
Controle	T5	x	x	x	X				
	T9	x	x	x		x	x		
	T19	x	x	x	X	x	x	x	x
P10	T5	x	x		X				
	T9	x	x				x		
	T19	x	x	x	X		x		x
P50	T5	x	x	x	X				
	T9	x	x	x	X	x	x	x	x
	T19	x	x	x	X	x	x		x

Legenda: AP: ácido palmítico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AE: ácido esteárico; AD: ácido duodecaenóico; MHD: heptadecaenóico; AU: ácido undecaenóico; CIS-EICO: cis-eicosaenóico.

Podemos sugerir que, a condição P50 no 9º dia de cultivo, seria a mais promissora para o cultivo em larga escala, na futura produção de biodiesel. As justificativas seriam: 1) para aplicação biotecnológica das microalgas nesta finalidade, é necessária uma quantidade significativa de biomassa para facilitar a extração dos lipídeos. Nesse tempo de cultivo, as condições P10 e P50

apresentaram biomassa muito semelhante (sem diferença significativa); 2) o conteúdo lipídico, ou seja, porcentagem de lipídeo por biomassa seca, deve ser elevado. P50 apresentou um maior conteúdo lipídico em relação a P10, no 9º dia de cultivo; 3) é necessário que o tempo de cultivo seja o menor possível para evitar aumento dos gastos no processo; 4) para a produção de um biodiesel com boas propriedades físico-químicas é necessária a presença de “FAME’s” de interesse. Logo, a condição P50 no 9º dia de cultivo, foi aquela que apresentou o melhor perfil; 5) com a utilização da condição P50, um menor aporte de insumos nutricionais seriam gastos no cultivo desses micro-organismos.

Uma tentativa para cultivar grandes quantidades de biomassa e ainda com altos conteúdos lipídicos seria um cultivo realizado em duas etapas, onde primeiramente não ocorreria limitação de nutriente no meio e depois o estímulo para acúmulo dos lipídios seria fornecido através do cultivo em meio com limitação nutricional.

5 CONCLUSÕES

- 1) A cepa ANRF-01 apresentou-se promissora na síntese de lipídeos de reserva e por isso foi selecionada para o experimento com variação nutricional.
- 2) A limitação do macronutriente fósforo no meio ASM-1 afetou diretamente e de forma proporcional o crescimento celular da microalga ANRF-01.
- 3) A via biossintética de clorofila-a sofreu declínio proporcional à limitação do fósforo de modo correlacionado com a fase de crescimento do organismo. Esta via energética foi provavelmente desviada para síntese lipídica.
- 4) As células cultivadas nos tratamentos P10 e P50 podem sofrer grandes danos fisiológicos (absorção de nitrogênio e divisão celular) quando mantidas por longos períodos nessas condições.
- 5) Ocorreu um aumento na produção de lipídeos quando em condições de deficiência de fósforo, sendo esta diretamente proporcional. Além disso, existiu relação entre aumento do conteúdo lipídico e fase de crescimento.
- 6) No 9º dia de cultivo as condições P10 e P50 apresentaram valores semelhantes de biomassa, porém na condição P50 observou-se maior

conteúdo lipídico, maior diversidade e síntese de ácidos graxos de interesse.

- 7)** A produção de biodiesel requer uma quantidade significativa de biomassa, conteúdo lipídico e ácidos graxos de interesse. Nesse contexto, a condição P50 no 9º dia de cultivo seria a mais interessante para esta aplicação. Além disso, seria economicamente mais vantajoso devido à redução do nutriente fornecido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUBRIOT L., BONILLA S. & FALKNER G. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *Microbiology Ecology*, 1-16, 2011.

BALASUBRAMANIAN S., ALLEN J. D., KANITKAR A. & BOLDOR D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. *Bioresource Technology*, 102, 3396-3403, 2011.

BARSANTI L. & GUALTIERI P. *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, 2006. CRC Press, Boca Raton.

BECKER W. Microalgae in human and animal nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed A. RICHMOND), Vol. 1, pp. 317-319, 2004. Blackwell Publishing Ltd.

BEN-AMOTZ A. & AVRON A. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* (eds R.C. Cresswell, T.A.V. Rees & N. Shah), pp. 91–114. Essex: Longman Sci. & Technical, 1989.

BEN-AMOTZ A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *Journal of Applied Phycology* 7, 65–68, 1995.

BLIGH E. G. & DYER W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917, 1959.

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

BØRSHEIM K. Y., VADSTEIN O., MYKLESTAD S. M., REINERTSEN H., KIRKVOLD S. & OLSEN Y. Photosynthetic algal production, accumulation and release of phytoplankton storage carbohydrates, and bacterial production in a gradient in daily nutrient supply. *Journal of Plankton Research*, 47:743-755, 2005.

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

COURCHESNE N. M. D., PARISIEN A., WANG B. & LAN C. Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 2009.

DEMIRBAS A., & DEMIRBAS M. F. "Importance of algae oil as a source of biodiesel." *Energy Conversion and Management*. 52:163-170, 2010.

DUBOIS M., GUILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A. & SMITH F. Calorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 18, p. 350-356, 1956.

FOGG G.E. & THAKE B. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3 rd edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London, 1987.

FOLCH J.; LEES M. & SLOANE STANLEY G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 497-509, 1957.

GARCIA M. C., FERNANDES SEVILLA J. M., ACIEN FERNANDES F. G., MOLINA GRIMA E. & GARCIA CAMACHO F. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *J. Appl. Phycol.*, 12, 239–48, 2000.

GOLDBERG I. K. & COHEN Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67, 696–701, 2006.

GORHAM P. R., MCLACHLAN J. R., HAMMER V. T. & KIM W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Internat. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, vol. 15, p. 796-804, 1964.

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

GRIFFITHS M. J. & HARRISON S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol*. DOI 10.1007/s10811-008-9392-7, 2008.

GROBBELAAR J. U. Algal Nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed A. RICHMOND), Vol. 1, pp. 97, 2004. Blackwell Publishing Ltd.

HU Q. Environmental effects on cell composition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed A. RICHMOND), Vol. 1, pp. 83-87, 2004. Blackwell Publishing Ltd.

JACOB-LOPES E., ZEPKA L. Q., PINTO L. A. A. & QUEIROZ M. I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, p. 63-69, 2007.

JEFFREY S. W. & HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pfl.*, v. 167, p. 191-194, 1975.

JOSEPH J. D., & ACKMAN R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488–506, 1992.

LI XIN A., HU HONG-YING A., GAN KE B. & SUN YING-XUE. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. *Bioresource Technology*, 101 p. 5494–5500, 2010.

LI Y., HORSMAN M., WANG B., WU N. & LAN C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 629-636, 2008a.

LORENZEN C.J. Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, v. 12, p. 343-346, 1967.

LOURENÇO S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. 1 ed. São Paulo: Rima, 606 p, 2006.

MARINHO M. M. & AZEVEDO S. M. F. O. “Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*”, *Aquatic Ecol.*, 2007.

MCMILLAN R. Morphogenesis and polymorphism of *Ankistrodesmus* spp.: *J. Gen. Microbiol.*, 17, 658-677, 1957.

MENDES R. L., REIS A. D. & PALAVRA A. F. Supercritical CO₂ extraction of linoleic acid and other lipids from *Arthorspira (Spirulina)maxima*: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry*. 99, 57-63, 2006.

MENDOZA A. V. Biodiesel from algae oil. Disponível em: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Biodiesel_from_Algae_Oil. Acesso em 24 out. 2011.

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

NARENDRA K. S. Nutrient removal, growth response and lipid enrichment by a phytoplankton community. *J. Algal Biomass Utln.* 1 (3):1-28, 2010.

PARK M. R., BAEK S. H., REYES B. G., YUN S. J. & HASENSTEIN K. H. Transcriptome profiling characterizes phosphate deficiency effects on carbohydrate metabolism in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* (2011), doi:10.1016/j.jplph.2011.09.002.

POHL P. Lipids and fatty acids in microalgae. In: *Handbook of Biosolar Resource* (ed. O.R. Zaborsky), Vol. 1, pp. 383–404, 1982. CRC Press, Boca Raton, USA.

REIJNDERS L. Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?. *Trends in Biotechnology* Vol.26 No.7, 2008.

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

ROSENBERG J., OYLER G., WILKINSON L., & BETENBAUGH M. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Biotechnology*. 19:430-436, 2008.

SIEBURTH J. M. C. N., SMETACEK V. & LENZ J. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, 23, 1256–63, 1978.

TOMASELLI L. The microalgal cell. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed A. RICHMOND), Vol. 1, pp. 3, 2004. Blackwell Publishing Ltd.

YAO B., XI B. D., HU C. M., HUO S. L., SU J. & LIU H. L. A model and experimental study of phosphate uptake kinetics in algae: Considering surface adsorption and P-stress. *Journal of Environmental Sciences*, 23(2): 189-198, 2011.