



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÁCIDOS GRAXOS POR DIFERENTES  
MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Ana Priscila Centeno da Rosa

Prof. Jorge Alberto Vieira Costa

ORIENTADOR

Rio Grande, RS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÁCIDOS GRAXOS POR DIFERENTES  
MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Eng<sup>a</sup>. Ana Priscila Centeno da Rosa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande como requisito para obtenção do título de Doutor.

Prof. Jorge Alberto Vieira Costa

ORIENTADOR

Rio Grande, RS

2012

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Zeni Centeno da Rosa e Adão Martins da Rosa, pela educação, incentivo, carinho, amor e apoio em todas as minhas escolhas.

Ao meu orientador Professor Dr. Jorge Alberto Vieira Costa por todas as oportunidades, confiança, amizade e experiências transmitidas.

Ao Professor Mario Tredici e a pesquisadora Graziella Chini Zittelli, pela oportunidade de desenvolver parte da minha tese junto a seu grupo de pesquisa na Itália.

Ao meu esposo Moisés, pelo apoio, companheirismo, amor e muita paciência.

Aos meus irmãos Celia e Luciano, pela amizade, companheirismo e carinho.

A toda minha família pela compreensão dos momentos ausentes e carinho.

As minhas amigas e iniciantes científicas Luiza Moraes e Etiele Moraes, pela amizade, dedicação e competência no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas colegas e amigas Ana Cláudia Margarites, Cristiane Lisboa, Elisângela Radmann, Lisiane Carvalho, Sabrina de La Rocha, Shana Ferreira e Thaisa Santos, pela amizade, ajuda e adorável convívio.

Aos demais colegas de laboratório, pela amizade, momentos de descontração e contribuição que de uma forma ou de outra deram ao trabalho.

Aos funcionários da FURG Roque Zilio e Islanda Passos, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da FURG que de uma maneira ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Andréa Ronqui, Carolina Krelling, Gabriela Garrastazu e Ricardo Sontag, pela amizade em um momento tão importante e por fazerem minha estadia na Itália ser inesquecível.

A amiga Silvia Venturini, pela colaboração no trabalho, amizade, carinho e por me fazer sentir em casa mesmo estando tão longe.

A Universidade Federal do Rio Grande, por proporcionar um programa de pós-graduação de qualidade e gratuito.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS _____	vi
LISTA DE FIGURAS _____	viii
RESUMO _____	xi
ABSTRACT _____	xii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO _____	1
1 INTRODUÇÃO _____	2
2 OBJETIVOS _____	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	3
3 JUSTIFICATIVA _____	4
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	6
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	7
4.1 MICROALGAS _____	7
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO _____	9
4.2.1 Temperatura _____	9
4.2.2 Iluminância _____	10
4.2.3 pH _____	12
4.2.4 Nutrientes _____	12
4.2.4.1 Fonte de Carbono _____	13
4.2.4.2 Fonte de Nitrogênio _____	13
4.2.4.3 Fonte de Fósforo _____	14
4.2.5 Agitação _____	14
4.3 BIORREACTORES _____	15
4.3.1 Biorreatores Abertos _____	15
4.3.2 Biorreatores Fechados _____	16
4.4 BIOPRODUTOS _____	19
4.4.1 Ácidos Graxos _____	20
REFERÊNCIAS _____	23
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO _____	32
AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 _____	33
RESUMO _____	33

ABSTRACT _____	33
1 INTRODUÇÃO _____	34
2 MATERIAL E MÉTODOS _____	35
2.1 Micro-organismo e Meio de cultivo _____	35
2.2 Condições de Cultivo _____	35
2.2.1 Efeito do sombreamento em GWP verticais _____	36
2.2.1.1 GWP Limitados por superfície externa _____	36
2.2.1.2 GWP Sem interferência das laterais leste e oeste _____	37
2.2.1.3 Simulação de uma planta de produção de microalgas em GWP _____	38
2.2.2 GWP vertical e inclinado para o sul _____	38
2.2.3 GWP vertical, inclinado para o sul e inclinado para o norte _____	38
2.3 Determinações Analíticas _____	39
2.4 Avaliação do Crescimento _____	39
2.5 Análise estatística _____	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	40
4 CONCLUSÃO _____	49
AGRADECIMENTOS _____	50
5 REFERÊNCIAS _____	50
PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELA MICROALGA <i>Nannochloropsis oculata</i> EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS _____	54
RESUMO _____	54
ABSTRACT _____	54
1 INTRODUÇÃO _____	55
2 MATERIAL E MÉTODOS _____	56
2.1 Micro-organismo e meio de cultivo _____	56
2.2 Condições de cultivo _____	56
2.3 Determinações analíticas _____	57
2.4 Avaliação do Crescimento _____	58
2.5 Análise estatística _____	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	58
4 CONCLUSÕES _____	67
AGRADECIMENTOS _____	67
5 REFERÊNCIAS _____	67

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELAS MICROALGAS <i>Chlorella vulgaris</i> E <i>Chlorella kessleri</i> EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS _____	71
RESUMO _____	71
ABSTRACT _____	71
1 INTRODUÇÃO _____	72
2 MATERIAL E MÉTODOS _____	73
2.1 Micro-organismos e Meios de cultivo _____	73
2.2 Condições de Cultivo _____	73
2.3 Determinações Analíticas _____	75
2.4 Avaliação do Crescimento _____	75
2.5 Análise Estatística _____	76
4 CONCLUSÃO _____	83
AGRADECIMENTOS _____	83
5 REFERÊNCIAS _____	84
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL _____	87
5 CONCLUSÃO GERAL _____	88
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	90
APÊNDICES _____	91
APÊNDICE 1 CULTIVO DE <i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 EM FOTOBIORREACTORES GREEN WALL PANEL _____	92
APÊNDICE 2 CULTIVOS DE <i>Nannochloropsis oculata</i> _____	93
APÊNDICE 3 CULTIVOS DE <i>Chlorella vulgaris</i> E <i>Chlorella kessleri</i> _____	93
APÊNDICE 4 FOTOS DAS CÉLULAS DAS MICROALGAS _____	94
ANEXOS _____	95
ANEXO A - MEIOS DE CULTIVO _____	96

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Principais aplicações e sistemas de cultivo de algumas microalgas. ....	8
TABELA 2 Aplicação de bioprodutos sintetizados por microalgas.....	20
 <b>ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i></b>	
TABELA 1 Concentração de proteínas, lipídios e carboidratos, em base seca, da microalga <i>T. suecica</i> F&M-M33 .....	48
 <b>ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELA MICROALGA <i>Nannochloropsis oculata</i> EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS</b>	
TABELA 1 Níveis reais e codificados utilizados nos dois planejamentos experimentais .....	57
TABELA 2 Concentração celular máxima ( $X_{máx}$ , g.L <sup>-1</sup> ) e produtividade máxima ( $P_{máx}$ , mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) para os cultivos autotróficos e mixotróficos da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	59
TABELA 3 Estimativa dos efeitos das variáveis fonte de carbono, temperatura (T, °C) e concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ , mg.L <sup>-1</sup> ) e de interação entre as variáveis na concentração celular máxima ( $X_{máx}$ , g.L <sup>-1</sup> ) e produtividade máxima ( $P_{máx}$ , mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) dos cultivos autotróficos .....	61
TABELA 4 Estimativa dos efeitos das variáveis fonte de carbono, temperatura (T, °C) e concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ , mg.L <sup>-1</sup> ) e de interação entre as variáveis na concentração celular máxima ( $X_{máx}$ , g.L <sup>-1</sup> ) e produtividade máxima ( $P_{máx}$ , mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) dos cultivos mixotróficos.....	62
TABELA 5 Concentração dos principais ácidos graxos presentes na biomassa da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada autotróficamente .....	63
TABELA 6 Concentração dos principais ácidos graxos presentes na biomassa da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada mixotróficamente.....	63
 <b>ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELAS MICROALGAS <i>Chlorella vulgaris</i> E <i>Chlorella kessleri</i> EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS</b>	
TABELA 1 Matriz do planejamento experimental Plackett Burman 2 <sup>7-4</sup> para os cultivos autotróficos .....	74

TABELA 2 Matriz do planejamento experimental Plackett Burman $2^{7-4}$ para os cultivos mixotróficos .....	74
TABELA 3 Concentração celular máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ , $g.L^{-1}$ ) e produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ , $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ) para os cultivos autotróficos e mixotróficos das microalgas <i>C. vulgaris</i> e <i>C. kessleri</i> .....	76
TABELA 4 Estimativa dos efeitos das variáveis microalga, fotoperíodo, concentração de $CO_2$ ( $S_{CO_2}$ , %), concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ , $mg.L^{-1}$ ), concentração de ferro ( $S_{Fe}$ , $mg.L^{-1}$ ), meio de cultivo e concentração celular inicial ( $X_0$ , $g.L^{-1}$ ) na concentração celular máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ , $g.L^{-1}$ ) e produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ , $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ) dos cultivos autotróficos .....	78
TABELA 5 Estimativa dos efeitos das variáveis microalga, fonte de carbono orgânico, concentração de carbono orgânico ( $S_{Co}$ , $g.L^{-1}$ ), concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ , $mg.L^{-1}$ ), concentração de bicarbonato de sódio ( $S_{NaHCO_3}$ , $g.L^{-1}$ ), meio de cultivo e concentração celular inicial ( $X_0$ , $g.L^{-1}$ ) na concentração celular máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ , $g.L^{-1}$ ) e produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ , $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ) dos cultivos mixotróficos.....	79
TABELA 6 Concentração (%) dos principais ácidos graxos, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e $\omega 3+\omega 6$ presentes na biomassa da microalga <i>C. vulgaris</i> e <i>C. kessleri</i> nos cultivos autotróficos.....	80
TABELA 7 Concentração (%) dos principais ácidos graxos, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e $\omega 3+\omega 6$ presentes na biomassa da microalga <i>C. vulgaris</i> e <i>C. kessleri</i> nos cultivos mixotróficos.....	81

## **ANEXO - MEIOS DE CULTIVO**

TABELA 1 Composição do MBM.....	96
TABELA 2 Composição do Meio F/2.....	97
TABELA 3 Solução de metais.....	97
TABELA 4 Solução de vitaminas .....	97



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Biorreatores tipo “raceway” de 5 L (a), 650 L (b) e 10 000 L (c). Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica .....	16
FIGURA 2 Fotobiorreatores tubulares horizontal (a) e vertical (b) no Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG; Fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> (c) e tubulares horizontal (d) em Florença, Itália. ....	18
<b>ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i></b>	
FIGURA 1 Fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> dispostos paralelamente e limitados por uma superfície fechada.....	37
FIGURA 2 Fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> dispostos paralelamente e sem interferência das laterais leste e oeste. ....	37
FIGURA 3 Fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> dispostos paralelamente simulando uma planta de produção de microalgas. ....	38
FIGURA 4 Fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> isolados na vertical (a), inclinado para o sul (b) e inclinado para o norte (c).....	39
FIGURA 5 Radiação solar (●) e produtividade da <i>T. suecica</i> F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (■), 20% (■) e 40% (■), em fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> limitados por uma superfície externa .....	41
FIGURA 6 Curvas de crescimento da <i>T. suecica</i> F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (●), 20% (●) e 40% (●), em fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> limitados por uma superfície externa.....	41
FIGURA 7 Radiação solar (●) e produtividade da <i>T. suecica</i> F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (■), 20% (■) e 40% (■), em fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> sem a interferência das laterais leste e oeste	42
FIGURA 8 Curvas de crescimento da <i>T. suecica</i> F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (●), 20% (●) e 40% (●), em fotobiorreatores <i>Green Wall Panel</i> sem a interferência das laterais leste e oeste.....	43
FIGURA 9 Radiação solar (●) e produtividade da <i>T. suecica</i> F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (■) e 20% (■), simulando uma planta de produção de microalgas .....	44

FIGURA 10	Curvas de crescimento da <i>T. suecica</i> F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (●) e 20% (●), simulando uma planta de produção de microalgas .....	44
FIGURA 11	Radiação solar (●) e produtividade da <i>T. suecica</i> F&M-M33 cultivada em fotobiorreator <i>Green Wall Panel</i> vertical (■) e <i>Green Wall Panel</i> inclinado para o sul (■) com concentrações iguais (50 g.m <sup>-2</sup> ) .....	45
FIGURA 12	Radiação solar (●) e produtividade da <i>T. suecica</i> F&M-M33 cultivada em fotobiorreator <i>Green Wall Panel</i> vertical (■) e <i>Green Wall Panel</i> inclinado para o sul (■) com diferentes concentrações (GWP-V: 50 g.m <sup>-2</sup> ; GWP-IS: 70 g.m <sup>-2</sup> ) .....	46
FIGURA 13	Curvas de crescimento da <i>T. suecica</i> F&M-M33 cultivada em fotobiorreator <i>Green Wall Panel</i> vertical e inclinado para o sul com concentrações iguais (●: GWP-V; ●: GWP-IS) e concentrações diferentes (●: GWP-V; ●: GWP-IS) .....	46
FIGURA 14	Radiação solar (●) e produtividade da <i>T. suecica</i> F&M-M33 cultivada em fotobiorreator <i>Green Wall Panel</i> vertical (■), <i>Green Wall Panel</i> inclinado para o sul (■) e <i>Green Wall Panel</i> inclinado para o norte (■) .....	47
FIGURA 15	Curvas de crescimento da <i>T. suecica</i> F&M-M33 cultivada em fotobiorreator <i>Green Wall Panel</i> vertical (●), <i>Green Wall Panel</i> inclinado para o sul (●) e <i>Green Wall Panel</i> inclinado para o norte (●) .....	47
FIGURA 16	Variação diurna da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) incidida nas faces sul dos fotobiorreatores GWP-V (●), GWP-IS (●), GWP-IN (●) e superfície horizontal (●) .....	49

## ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

FIGURA 1	Diagrama de Pareto dos efeitos da fonte de carbono, temperatura e concentração de NO <sub>3</sub> (S <sub>NO3</sub> ) na concentração de PUFA para os ensaios autotróficos (a) e mixotróficos (b) .....	66
----------	---	----

## ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* E *Chlorella kessleri* EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

FIGURA 1	Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração de CO <sub>2</sub> (S <sub>CO2</sub> ), concentração celular inicial (X <sub>0</sub> ), fotoperíodo, meio de cultivo, concentração de nitrato no meio (S <sub>NO3</sub> ), concentração de ferro no meio (S <sub>Fe</sub> ) e microalga, na concentração de PUFA dos cultivos autotróficos. ....	82
----------	--	----

FIGURA 2 Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração de bicarbonato de sódio no meio ( $S_{NaHCO_3}$ ), concentração celular inicial ( $X_0$ ), meio de cultivo, concentração de carbono orgânico no meio ( $S_{Co}$ ), concentração de nitrato no meio ( $S_{NO_3}$ ), fonte de carbono orgânico e microalga, na concentração de PUFA dos cultivos mixotróficos.....	82
---	----

#### **APÊNDICE 4 FOTOS DAS CÉLULAS DAS MICROALGAS**

FIGURA 1 Células de <i>Tetraselmis suecica</i> .....	94
FIGURA 2 Células de <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	94
FIGURA 3 Células de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	94
FIGURA 4 Células de <i>Chlorella kessleri</i> .....	94

## RESUMO

Devido a sua composição bioquímica, as microalgas apresentam o potencial de serem adicionadas diretamente a alimentos e ração animal, ou indiretamente por meio da adição dos biocompostos produzidos pelas mesmas. Além disso podem ser utilizadas na biofixação de CO<sub>2</sub> e na produção de biocombustíveis. O objetivo deste trabalho foi produzir biomassa e ácidos graxos por diferentes microalgas e condições de cultivo. Para o desenvolvimento do trabalho, este foi dividido em três etapas: (i) avaliação da influência da atenuação da intensidade luminosa na produção e composição da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33; (ii) avaliação do crescimento e produção de ácidos graxos pela microalga *Nannochloropsis oculata* em cultivos autotróficos e mixotróficos; e (iii) avaliação do crescimento e produção de ácidos graxos pelas microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* em cultivos autotróficos e mixotróficos. No cultivo da microalga *T. suecica* F&M-M33 a produtividade foi influenciada pela concentração celular mantida nos cultivos bem como pela radiação solar incidida. Quando os ensaios foram realizados em fotobiorreatores inclinados, estes apresentaram produtividade máxima de 0,96 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Quando realizados em GWP verticais, dispostos paralelamente, a produtividade máxima obtida foi 0,45 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. As máximas concentrações proteicas (49,87 a 51,01%) e lipídicas (22,03 a 23,36%) foram obtidas quando a microalga foi cultivada nos fotobiorreatores verticais e dispostos paralelamente sem interferência de sombreamento nas laterais. Para a microalga *N. oculata* foram realizados 2 planejamentos fatoriais 2<sup>3</sup>, em que foram variadas a temperatura, concentração de nitrato no meio de cultivo e fonte de carbono. Os máximos valores para o crescimento celular e produtividade foram obtidos no cultivo mixotrófico (0,64 g.L<sup>-1</sup> e 141,95 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente), quando a microalga *N. oculata* foi cultivada em meio F/2 utilizando 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose como fonte orgânica de carbono, 75 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub> e 20 °C. Para o cultivo autotrófico as máximas concentração celular e produtividade (0,62 g.L<sup>-1</sup> e 69,78 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente) foram obtidas quando a microalga foi cultivada com 1 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub> e 20 °C. Os principais ácidos graxos encontrados em ambos os cultivos foram o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1) e ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega$ -3), destacando-se o ácido palmítico (C16:0) que apresentou concentrações de 21,4 a 47% do total dos ácidos graxos analisados. Os cultivos das microalgas *C. vulgaris* e *C. kessleri* foram avaliados utilizando metodologia de Planejamento Experimental Plackett Burman. A microalga *C. vulgaris* apresentou concentração celular máxima (0,97 g.L<sup>-1</sup>) no cultivo autotrófico, com fotoperíodo 24 h claro e 6% de CO<sub>2</sub>. A máxima produtividade (180,68 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi obtida no cultivo mixotrófico para *C. vulgaris* cultivada com 1 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e 5 g.L<sup>-1</sup> de resíduo industrial de oleaginosas (RIO). O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido graxo obtido em maiores concentrações tanto para os cultivos autotróficos (21,22 a 53,78%) como para os mixotróficos (25,43 a 45,98%). A concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) variou de 12,19 a 41,17% nos cultivos autotróficos e de 10,98 a 34,26% nos cultivos mixotróficos, mas não foi afetada significativamente (p<0,05) pela microalga utilizada, podendo tanto a *C. vulgaris* como a *C. kessleri* serem utilizadas como fonte de ácidos graxos saturados e insaturados.

**Palavras-chave:** ácidos graxos, microalgas, planejamento experimental, PUFA, resíduo.

## ABSTRACT

Due to its biochemical composition, microalgae are a potential group to be added directly, or indirectly by the addition of microalgae produced biocompounds, in food and feed. In addition, while producing the biomass, the culture may be utilized in carbon dioxide biofixation, as well as the final biomass can be directed to second generation biofuels production. The aim of this work was to produce biomass and fatty acids by different microalgae and growing conditions. To develop this work, it was divided into three stages: (i) light mitigation influence in *Tetraselmis suecica* F&M-M33 production and composition; (ii) growth profile and fatty acids production evaluation by the microalgae *Nannochloropsis oculata* in autotrophic and mixotrophic cultures; and (iii) growth profile and fatty acids production evaluation by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella kessleri* in autotrophic and mixotrophic cultures. In the *T. suecica* F&M-M33 culture, the productivity was influenced by solar radiation and the cultures cellular concentrations. When the cultures were realized in inclined photobioreactor the productivity achieved maximum values of  $0.96 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . When the cultures were realized in vertical GWP arranged in parallel, maximum achieved productivity was  $0.45 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Maximum protein (49.87 a 51.01%) and lipid (22.03 a 23.36%) concentrations were obtained in cultures with vertical photobioreactors arranged in parallel, avoiding shadow interference among themselves. To the microalgae *N. oculata* were carried out two  $2^3$  factorial design, where the studied variables were temperature, nitrate concentration in the medium and carbon source. The highest growth rate and biomass productivity were achieved in the mixotrophic culture ( $0.64 \text{ g.L}^{-1}$  and  $141.95 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectively), when the microalgae *N. oculata* was cultivated in F/2 media utilizing  $1 \text{ g.L}^{-1}$  of glucose as carbon source,  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  of  $\text{NO}_3$  and  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . In the autotrophic culture, maximum cellular concentration and productivity culture ( $0.62 \text{ g.L}^{-1}$  and  $69.78 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectively) were obtained when the microalgae was cultivated  $1 \text{ g.L}^{-1}$  of  $\text{NaHCO}_3$ ,  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  of  $\text{NO}_3$  and  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The main fatty acids present in the cultures were the myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 $\omega$ -3), with emphasis on C16:0, which appeared in the highest concentrations, representing 21.4 and 47% of the analyzed fatty acids. The culture of *C. vulgaris* and *C. kessleri* were evaluated through a Plackett Burman Experimental Design. The microalgae *C. vulgaris* presented maximum cellular concentration ( $0.97 \text{ g.L}^{-1}$ ) in the autotrophic culture with 24 h photoperiod bright/dark and 6% of  $\text{CO}_2$ . Maximum productivity ( $180.68 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) was obtained by *C. vulgaris* mixotrophic culture with  $1 \text{ g.L}^{-1}$  of  $\text{NaHCO}_3$  and  $5 \text{ g.L}^{-1}$  of industrial waste oilseeds (RIO). The palmitic acid (C16:0) was the fatty acid with the highest concentration in the autotrophic culture (21.22 a 53.78%) as well as in the mixotrophic (25.43 a 45.98%). The polyunsaturated fatty acid concentration varied between 12.19 and 41.17% in the autotrophic cultures and between 10.98 and 34.26% in the mixotrophic cultures. However, its production was not statistically affected ( $p < 0,05$ ) by the utilized microalgae. Therefore, both microalgae, *C. vulgaris* and *C. kessleri*, may be utilized as a saturated and unsaturated fatty acid source.

**Key-words:** Factorial design, fatty acids, microalgae, PUFA, waste.

## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos, principalmente o cultivo de microalgas, têm recebido crescente interesse em virtude de suas características, como uso de luz solar como principal fonte de energia e alta produtividade, com baixo impacto ambiental.

Devido a grande biodiversidade, as microalgas podem produzir uma enorme variedade de compostos de alto valor para nutrição humana e animal, aplicações na medicina, cosméticos e indústria agroquímica. Tendências recentes em pesquisa farmacêutica sugerem que as microalgas e cianobactérias são o grupo mais promissor para fornecimento de novos ativos biofarmacológicos, incluindo compostos antimicrobianos, antivirais e antitumorais.

Uma tendência na utilização de cultivos microalgais é na recuperação/remediação de resíduos industriais, sendo este processo combinado com um processo de biofixação de CO<sub>2</sub> e produção de biocombustíveis a partir da biomassa produzida.

Uma das vantagens das microalgas com relação às plantas está em sua versatilidade metabólica, podendo sofrer modificações em suas vias bioquímicas e composição celular, por meio da variação das condições de cultivo. Essas variações nas condições de cultivo podem ser realizadas para otimizar a produção de compostos de interesse, como os ácidos graxos, que são os principais constituintes dos lipídios. Atualmente, sua produção comercial é realizada através da extração de fontes vegetais como soja, linhaça e canola, e também de fontes animais como peixes.

As microalgas são uma fonte alternativa para produção de ácidos graxos, já que apresentam concentração de lipídios na biomassa que, dependendo das condições de cultivo, pode alcançar 77%, sendo que em algumas espécies, os ácidos graxos representam entre 25 e 60% dos lipídios totais.

A produção comercial de microalgas é realizada em biorreatores que utilizam a energia luminosa como principal fonte de energia para o processo fotossintético. Estes biorreatores podem ser abertos ou fechados, e a escolha depende, principalmente, dos bioprodutos de interesse. A produção de biomassa em fotobiorreatores traz algumas vantagens, como diminuição dos riscos de contaminação, maior eficiência fotossintética e melhor controle das condições de cultivo.

Porém, para a produção de biomassa microalgal em grande escala, com objetivo de obtenção de bioprodutos de alto valor agregado, mas com menor custo de produção, se faz necessária a pesquisa de fontes alternativas de nutrientes, condições de cultivo que promovam maiores produtividades, bem como a influência de parâmetros como a energia luminosa para a sua produção.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi produzir biomassa e ácidos graxos por diferentes microalgas e condições de cultivo.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência da atenuação da intensidade luminosa na produção da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel*.

Avaliar a influência da atenuação da intensidade luminosa na composição da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel*.

Avaliar o crescimento e o perfil de ácidos graxos da microalga *Nannochloropsis oculata* em cultivos autotróficos e mixotróficos.

Avaliar o crescimento e o perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* em cultivos autotróficos e mixotróficos utilizando um Planejamento Experimental Plackett Burman.



### 3 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) possui uma estrutura dedicada ao estudo do cultivo de microalgas desde 1996. A linha de pesquisa já envolveu o estudo de cultivos semicontínuos (RADMANN et al., 2007; REICHERT et al., 2006), biorreatores abertos (MORAIS et al., 2009; COSTA et al., 2003); perfil de ácidos graxos (MORAIS e COSTA, 2008; RADMANN e COSTA, 2008; COSTA et al., 2006), isolamento de cepas (RADMANN et al., 2011; MORAIS et al., 2008), biofixação de CO<sub>2</sub> utilizando microalgas (ROSA et al., 2011; MORAIS e COSTA, 2007) fontes de nutrientes alternativas (ANDRADE e COSTA, 2007; COSTA et al., 2001) formulação de produtos alimentícios adicionados de biomassa de *Spirulina* (MORAIS et al., 2006), desenvolvimento de nanofibras de *Spirulina* (MORAIS et al., 2010), entre outros estudos.

O LEB conta também com duas plantas pilotos de produção de microalgas. A mais antiga, no município de Santa Vitória do Palmar/RS às margens da Lagoa Mangueira, entre o Oceano Atlântico e a Lagoa Mirim, montada através de uma rede de cooperação que inclui prefeituras, organizações não governamentais e empresas públicas e privadas. São 3 biorreatores do tipo *raceway* com 12.000 L cada e um de 1.000 L para propagação de inóculo.

Em 2004 o LEB iniciou convênios com a ELETROBRÁS (Centrais Elétricas Brasileiras S. A.) e CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), para desenvolvimento de tecnologia para biofixação de CO<sub>2</sub> originado na combustão do carvão mineral por microalgas. Como produto deste convênio foi projetada, montada e colocada em operação a Planta Piloto de Biofixação de CO<sub>2</sub> por Microalgas, localizada no município de Candiota/RS na Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM/CGTEE, formada por um sistema modular composto por 2 containers-laboratório de 28,3 m<sup>2</sup> cada, 2 biorreatores do tipo *raceway* com volume de 18.000 L cada e um de 1.000 L, para crescimento e manutenção de inóculo.

Para o desenvolvimento deste trabalho o LEB fez uma parceria com o Laboratório de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (UniFI, Itália), coordenado pelo Prof. Mário Tredici. O trabalho foi desenvolvido no Istituto per lo Studio degli Ecosistemi - Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISE-CNR, Itália) sob a supervisão da pesquisadora Graziella Chini Zittelli, onde foi estudada a influência da atenuação da intensidade luminosa na produção de biomassa da microalga *Tetraselmis suecica*, bem como na composição da biomassa produzida.

As demais etapas do trabalho foram realizadas no LEB onde foi estudada a produção de ácidos graxos pelas microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri*, em diferentes condições de cultivo.

Devido a sua composição bioquímica, as microalgas apresentam o potencial de serem adicionadas diretamente a alimentos, ou indiretamente através da adição dos biocompostos produzidos pelas mesmas, com a finalidade de aumentar seu valor nutricional.

As microalgas utilizam o mecanismo fotossintético para produção de biomassa. Conforme as condições de cultivo como temperatura, iluminância e concentração de nutrientes, podem produzir determinados compostos como vitaminas, proteínas e ácidos graxos.

Uma das fontes de ácidos graxos mais utilizada é o óleo de pescado e com isto grande parte da produção deste alimento é destinada a extração destes biocompostos (MILLEDGE, 2011). Uma alternativa para produção de ácidos graxos com alto valor agregado é o cultivo de microalgas, já que estas são produtoras primárias destes compostos que são bioacumulados por meio da cadeia alimentar, por várias espécies aquáticas (WEN e CHEN, 2003).

Diversos estudos mostram essa possibilidade de utilização de microalgas na produção de ácidos graxos, com destaque para a produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), que são essenciais para a dieta humana e não podem ser sintetizados pelo organismo (KHOEYI et al., 2012; PRAVEENKUMAR et al., 2012; RECHT et al., 2012; WAGENEN et al., 2012)

A biomassa obtida nos cultivos de microalgas também pode ser utilizada na formulação de alimento humano (VARFOLOMEEV e WASSERMAN, 2011; MORAIS et al., 2006) e ração animal (GRINSTEAD et al., 2000; GOUVEIA et al., 1998) além de ser utilizada para extração pigmentos e vitaminas (SAJILATA et al., 2008; PATIL et al., 2008; MENDIOLA et al., 2008; CAMPO et al., 2007), e na produção de compostos antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórios e antimicrobianos (GUEDES et al., 2011). Estudos também têm mostrado sua aplicação na produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007a; CHISTI, 2007b; SCRAGG et al., 2003; SCRAGG et al., 2002) e na mitigação de gases que causam do efeito estufa (ROSA et al., 2011; MORAIS e COSTA, 2007a; MORAIS e COSTA, 2007b; MORAIS e COSTA, 2007c).

## **CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 MICROALGAS

As microalgas representam os micro-organismos fotossintéticos procarióticos e eucarióticos que vivem em meio ambiente aquático (VONSHAK, 1997), são unicelulares e formam a base da cadeia alimentar em corpos aquáticos (SATYANARAYANA et al., 2011). Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor proteico superior a 50% e alcançando produtividades de 30-50 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> em peso seco (GOLDMAN, 1980).

O crescimento de microalgas é determinado por fatores abióticos, como intensidade luminosa, temperatura, concentração de nutrientes e pH; e bióticos como a contaminação por fungos e bactérias (VARFOLOMEEV e WASSERMAN, 2011).

O cultivo de microalgas pode ser utilizado na remoção de nutrientes, contaminantes orgânicos, metais pesados e patógenos de águas residuais, fornecendo subproduto que pode ser utilizado na produção de compostos de alto valor agregado ou na produção de biocombustíveis (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006).

As microalgas, além de apresentarem propriedades antioxidantes e serem fontes de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e aminoácidos essenciais, podem apresentar altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (NATRAH et al., 2007).

A principal utilização comercial das microalgas é como suplemento alimentar, em que a biomassa ou seu extrato é incorporada em alimentos ou misturas pré-prontas. Os gêneros mais comercializados são a *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus*, principalmente por seu valor nutricional e facilidade de cultivo (TREDICI et al., 2009).

A Tabela 1 apresenta as principais produções comerciais de microalgas e as principais aplicações.

TABELA 1: Principais aplicações e sistemas de cultivo de algumas microalgas.

Microalga	Produção (ton.ano <sup>-1</sup> )	Sistema de cultivo	Local	Aplicações
<i>Arthrospira</i>	3000*	Raceway e lagos naturais	Ásia e EUA	Suplemento alimentar, cosméticos, aditivos para rações
<i>Aphanizomenon</i>	500*	Lagos naturais	EUA	Suplemento alimentar
<i>Nostoc</i>	600*	Solos áridos e semi-áridos	Ásia e América	<i>Health food</i>
<i>Chlorella</i>	2000*	Tanques circulares, fermentadores e FBR	Ásia e Alemanha	Suplemento alimentar, cosméticos e aquicultura
<i>Dunaliella</i>	1200*	Raceway e lagos naturais	Austrália, Israel e Ásia	Suplemento alimentar, cosméticos e $\beta$ -caroteno
<i>Haematococcus</i>	300*	Raceway e FBR	EUA e Israel	Suplemento alimentar, aquicultura e astaxantina
<i>Odontella</i>	n.a.	Raceway	França e Alemanha	Suplemento alimentar
<i>Cryptocodinium</i>	240 (lipídios)	Fermentadores (10-100 m <sup>3</sup> )	EUA	DHA como suplemento alimentar, compostos nutracêuticos e aditivos para rações
<i>Schyzochytrium</i>	10 (lipídios)	Fermentadores (10-100 m <sup>3</sup> )	EUA	DHA como suplemento alimentar e aditivos para rações
<i>Ulkenia</i>	n.a.	Fermentadores (80 m <sup>3</sup> )	Alemanha	DHA como suplemento alimentar e compostos nutracêuticos
<i>Porphyridium</i>	n.a.	Bolsas plásticas e FBR	Israel	Cosméticos, ficoeritrina e AA

\*peso seco; n.a. = não avaliada; FBR = fotobiorreatores; DHA = ácido docosahexaenoico ( $\omega$ -3); AA = ácido araquidônico ( $\omega$ -6). Fonte: TREDICI et al., 2009.

## 4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A composição bioquímica das microalgas pode ser modificada por meio das variações nas condições de cultivo (MAHBOOD et al., 2012; PRAVEENKUMAR et al., 2012; OGBONDA et al., 2007; MURADYAN et al., 2004). Sob condições ótimas de crescimento, as células sintetizam, preferencialmente, proteínas que são utilizadas para o crescimento. No entanto, a velocidade de crescimento é reduzida por fatores limitantes como nutrientes, temperatura e iluminância e pode ocasionar maior produção de lipídios, carboidratos e outros metabólitos (SUKENIK, 1999).

Os processos de produção, de acumulação e de excreção de substâncias celulares oferecem importantes indicações sobre o estado fisiológico de uma microalga e podem estar relacionados às condições de cultivo empregadas, já que essas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. Desta maneira, a manipulação de condições de cultivo por meio da presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos e antioxidantes naturais (RICHMOND, 1990).

A produtividade de biomassa em um cultivo depende, principalmente, da iluminância e da temperatura, desde que as fontes de nutrientes sejam adequadas (SOEDER, 1990).

A concentração ótima de biomassa para se manter um sistema depende principalmente da intensidade luminosa e da configuração do reator. Segundo MUÑOZ e GUIEYSSE (2006), em altas intensidades luminosas, uma concentração elevada de biomassa pode ser uma alternativa para proteger a microalga da inibição pela luz.

### 4.2.1 Temperatura

Um dos efeitos mais importantes da temperatura no metabolismo das células é a influência na respiração, também conhecida como a fase escura da fotossíntese. A taxa de respiração aumenta exponencialmente com a temperatura e este fato faz com que haja variações na produção de biomassa microalgal. Temperaturas elevadas na fase escura do cultivo provocam aumento na taxa de respiração e com isto perda de biomassa (VONSHAK e RICHMOND, 1988), ao contrário, temperaturas baixas podem inibir o crescimento microalgal (KUMAR et al., 2010).

A temperatura tem grande influência na composição química das microalgas, como na concentração de ácidos graxos e na formação da estrutura de proteínas e

lipídios (FOX, 1996). A temperatura ótima de crescimento varia de acordo com a espécie, porém este parâmetro é influenciado por outras variáveis como a intensidade luminosa (KUMAR et al., 2010).

Para produção em grande escala de microalgas é importante o conhecimento do comportamento da temperatura do meio de cultivo, que diminui com o aumento da concentração celular, diminuindo a disponibilidade de irradiação às células no meio (RICHMOND, 1990).

Segundo FOX (1996) a produtividade da microalga *Spirulina* a 18°C é 46% da produtividade a 20°C. À temperaturas entre 22 e 32°C a produtividade dobra, permanecendo constante até 40°C. A temperatura ótima para cultivo de *Spirulina* varia de 35 a 37°C. Algumas microalgas são tolerantes a temperaturas muito elevadas, como a *Chlorella*, que mantém seu crescimento a temperaturas em torno de 42°C (SAKAI et al., 1995).

Segundo OGBONNA e TANAKA (1998) o decréscimo na concentração de biomassa durante a noite pode ser superior a 17% porém depende da fase de crescimento, das temperaturas do dia e da noite, bem como das intensidades luminosas durante o dia. Os métodos utilizados para minimizar estas perdas são redução da temperatura e controle da agitação do cultivo durante a noite.

#### **4.2.2 Iluminância**

A intensidade luminosa e o comprimento de onda da fonte de iluminação influenciam diretamente no crescimento de microalgas. Os cloroplastos, responsáveis pela fotossíntese, podem ser irreversivelmente destruídos a altas intensidades de luz ultra violeta, por longos períodos de tempo (LIPS e AVISSAR, 1990).

A luz solar é a fonte mais usual de energia para as microalgas, e a quantidade de luz necessária para um crescimento ótimo depende de cada espécie, sendo normalmente inferior à quantidade requerida por plantas superiores (KUMAR et al., 2010).

Níveis extremos de iluminância no cultivo de microalgas podem conduzir a um processo desfavorável ao crescimento, a fotoinibição, que ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes

elétrons de alta energia reagem com a água e formam peróxido de hidrogênio, tóxico às células (GRIMA et al., 1996).

A intensidade da saturação da luz ( $I_s$ ) é a máxima intensidade que pode ser absorvida pelo aparato fotossintético. Este valor é específico para cada espécie e varia entre 50 e 200  $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Em hor\u00e1rios de maior irradia\u00e7\u00e3o solar a ilumin\u00e2ncia pode exceder a 2.000  $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , impondo uma s\u00e9rie de limita\u00e7\u00f5es em cultivos *outdoor*, em que utilizam a luz solar como principal fonte de energia (TREDICI e CHINI ZITTELLI, 1998). E a manuten\u00e7\u00e3o de elevadas produtividades em cultivos *outdoor* \u00e9 essencial para que se consiga baixar os custos de produ\u00e7\u00e3o da biomassa.

A exposi\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas aos ciclos claro/escuro no interior do fotobiorreator \u00e9 um fator favor\u00e1vel ao crescimento, uma vez que manter as c\u00e9lulas iluminadas constantemente \u00e9 dif\u00edcil devido \u00e0 pequena altura contemplada pela adequada ilumin\u00e2ncia (VONSHAK *et al.*, 1982). O ciclo claro/escuro no interior da cultura depende da intensidade da luz, da altura do meio l\u00edquido, da agita\u00e7\u00e3o e da densidade celular. Segundo KUMAR et al. (2010) quando a intensidade luminosa \u00e9 o \u00fanico limitante do crescimento microalgal, a produtividade torna-se proporcional a efici\u00eancia de convers\u00e3o da energia.

A fotolimita\u00e7\u00e3o \u00e9 um fen\u00f4meno que ocorre devido ao sombreamento que as c\u00e9lulas da superf\u00edcie causam nas c\u00e9lulas em maiores profundidades no interior de meio de cultivo. Pode ocorrer em culturas muito concentradas, onde as c\u00e9lulas passam a maior parte do tempo nas camadas mal iluminadas, dentro do fotobiorreator.

Para melhor distribui\u00e7\u00e3o da luz e para que todas as c\u00e9lulas recebam a mesma intensidade luminosa no interior do fotobiorreator, devem ser notadas as seguintes vari\u00e1veis: profundidade da cultura, concentra\u00e7\u00e3o celular e agita\u00e7\u00e3o (TREDICI, 2010).

Segundo TREDICI (2010) o efeito da satura\u00e7\u00e3o da luz em culturas microalgais pode ser amenizado por meio da atenua\u00e7\u00e3o da luz (*light dilution*). A atenua\u00e7\u00e3o da luz significa distribuir o fluxo de f\u00f3tons que incidem no fotobiorreator de maneira a diminuir a intensidade luminosa e aumentar efici\u00eancia fotossint\u00e9tica. A principal desvantagem desta abordagem \u00e9 que, para atenuar a luz de forma significativa, a raz\u00e3o entre a \u00e1rea da superf\u00edcie iluminada do sistema e a \u00e1rea da superf\u00edcie ocupada deve ser substancialmente maior do que um, e isso requer uma \u00e1rea de superf\u00edcie iluminada muito grande, aumentando os custos de instala\u00e7\u00e3o.



### 4.2.3 pH

A maior parte das microalgas tem seu pH ótimo de crescimento em valores neutros, no entanto algumas espécies são tolerantes a altos valores de pH, como a *Spirulina* que tem seu crescimento favorecido em meios com pH 9,0; e também espécies que mantêm seu crescimento em meios com pH baixo, como a *Chlorococcum littorale* que cresce em pH 4,0 (KUMAR et al., 2010).

Em um cultivo de microalgas, a relação concentração de CO<sub>2</sub> e pH deve estar sempre sendo observada, pois o aumento na concentração de CO<sub>2</sub> no meio pode levar a um aumento na concentração celular, porém baixa o valor de pH, podendo inibir o crescimento, sendo então ideal o controle em tempo integral destas duas variáveis.

O pH também influencia na disponibilidade de nitrogênio para a célula, pois com pH abaixo de 8,0 há predominância de íon amônio. Em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma de amônia, que pode ser absorvida pela parede celular (BELKIN e BOUSSIBA, 1991).

### 4.2.4 Nutrientes

Para produção de biomassa com determinadas características desejadas, a composição do meio de cultivo é um fator fundamental, o que pode afetar a taxa de crescimento e o nível máximo da produção de biomassa. A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que a microalga adapte seu metabolismo à nova condição. Em geral, as modificações no meio mudam a composição bioquímica da biomassa, principalmente a composição de proteínas, lipídios e pigmentos (SÁNCHEZ et al., 2000).

É comum o emprego de meios de cultivo contendo quantidades elevadas de substâncias complexas, como extratos e hidrolisados (SCHMIDELL et al., 2001). Com o objetivo de minimizar custos de produção da biomassa microalgal e/ou seus bioprodutos, muitos estudos são realizados utilizando fontes alternativas de nutrientes como glicose (CHEN e ZHANG, 1997; MARQUEZ et al., 1993), melão (ANDRADE e COSTA, 2007), uréia (SOLETTI et al., 2005; COSTA et al., 2004; DANESI et al., 2002), entre outros.

#### 4.2.4.1 Fonte de Carbono

O dióxido de carbono é a principal fonte de carbono para o crescimento fotossintético e autotrófico de microalgas. O ar contém aproximadamente 0,038% (v/v) de CO<sub>2</sub>, sendo necessária a adição de CO<sub>2</sub> ao cultivo. Em lagos naturais as fontes de carbono utilizadas pelas microalgas são CO<sub>2</sub> atmosférico ou carbonatos (VONSHAK, 1997). O CO<sub>2</sub> como fonte de carbono recebe atenção especial para o cultivo de microalgas, pois pode ser gerado a partir da queima de combustíveis fósseis e ainda ser utilizado como nutriente para o cultivo destes micro-organismos.

O CO<sub>2</sub> reage com água formando ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Este ácido carbônico é dissociado em bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e íons H<sup>+</sup>, e o bicarbonato pode ser dissociado em CO<sub>2</sub> ou íons carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) dependendo do pH do meio de cultivo. Todas essas reações são rápidas, e como as microalgas retiram CO<sub>2</sub> da solução ela forma íons OH<sup>-</sup> e isto eleva o pH do meio (FOX, 1996).

Em baixa concentração extracelular de bicarbonato, as microalgas têm a capacidade de acumular o bicarbonato no meio intracelular e utilizar o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono para seu metabolismo. No meio contendo somente carbonato não ocorre aumento da biomassa e o pH mantém-se praticamente invariável (BINAGHI et al., 2003).

Sob condições heterotróficas e mixotróficas, algumas espécies de microalgas podem metabolizar uma variedade maior de fontes de carbono, como glicose, melão, ácido acético e ainda compostos presentes em resíduos industriais (KUMAR et al., 2010).

#### 4.2.4.2 Fonte de Nitrogênio

Nitrogênio é o segundo elemento mais importante, depois do carbono, para o crescimento celular. É o constituinte principal dos ácidos nucleicos e das proteínas, e está associado ao metabolismo primário das microalgas (KUMAR et al., 2010).

Grande variedade de compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, podem ser utilizados como fonte de nitrogênio para o cultivo de microalgas, devido à grande habilidade que estas possuem para utilizar nitrato, nitrito ou amônia (RICHMOND, 1990).

A deficiência de nitrogênio durante o crescimento provoca um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila, além de afetar a composição de ácidos graxos. Em

baixas concentrações no meio de cultivo, favorece o acúmulo de lipídios e polissacarídeos nas células (KAPLAN et al., 1990), porém pode provocar baixo crescimento celular (KUMAR et al., 2010).

#### 4.2.4.3 Fonte de Fósforo

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento de microalgas pois participa na transferência de energia intracelular, síntese de ácidos nucléicos e reações especiais associadas com divisão celular. Este nutriente geralmente é limitado para o crescimento de microalgas na natureza (KAPLAN et al., 1990).

A concentração de fosfatos orgânicos em águas naturais geralmente excedem a de fosfato inorgânico, que é a principal forma das células de microalgas utilizarem o fósforo. Fosfato orgânico é utilizado como fonte primária de fósforo, o qual é hidrolisado por enzimas extracelulares como fosfoesterases ou fosfatases, resultando em fósforo inorgânico. Os requerimentos de fósforo para o crescimento diferem entre espécies, até mesmo quando não existe fator externo limitante (RICHMOND, 1990).

#### 4.2.5 Agitação

A agitação nas culturas de microalgas está relacionada a alguns fatores que influenciam no crescimento celular. A agitação deve impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células (GRIMA et al., 1996), permitir a captação de CO<sub>2</sub> da atmosfera, liberação de O<sub>2</sub> do interior do meio líquido e diminuir os gradientes gasosos e de nutrientes no meio (JIMÉNEZ et al., 2003).

O estresse hidrodinâmico causado por excesso de agitação em culturas de microalgas pode provocar a quebra dos tricomas, com redução em seu tamanho, interferindo na colheita da microalga por filtração (VONSHAK, et al., 1982). A agitação insuficiente pode obrigar certas células a um regime de baixa incidência luminosa e até de escuridão, prejudicando seu crescimento (HOSAKA et al., 1995).

Biorreatores abertos do tipo *raceway*, em que se estabelece um fluxo através de divisória central são geralmente agitados por pás rotativas. O principal problema deste tipo de agitação é a turbulência insuficiente para garantir eficiente regime de luz às células (VONSHAK, 1997).

### 4.3 BIORREATORES

Há uma grande variedade de configurações possíveis para biorreatores, mas, no entanto, pode-se afirmar que os mais utilizados são os reatores agitados mecanicamente (STR), conhecidos também como reatores de mistura (SCHMIDELL et al., 2001).

O tipo de biorreator empregado no cultivo de microalgas está relacionado a variáveis que influem no crescimento celular, como contaminação das culturas, evaporação de água do meio, gradientes de intensidade luminosa no interior do meio de cultivo, variações de temperatura e duração dos ciclos claro-escuro (RORRER e CHENEY, 2004).

Segundo TREDICI e CHINI ZITTELLI (1998), o fotobiorreator ideal para o cultivo de microalgas deve maximizar a produtividade volumétrica e a eficiência fotossintética, porém na prática, é muito difícil obter os máximos valores destas duas respostas simultaneamente, devendo-se então procurar a melhor combinação possível entre a escolha do fotobiorreator e condições de cultivo para proporcionar elevadas produtividades com maior eficiência fotossintética.

A operação de biorreatores de grande porte, do ponto de vista técnico e econômico, praticamente exige o emprego de micro-organismos não patogênicos, os quais possam ser manuseados sem riscos ambientais (SCHMIDELL et al., 2001).

Os micro-organismos fotossintéticos podem ser cultivados em biorreatores abertos ou fechados (fotobiorreatores), sendo que o último apresenta maior eficiência fotossintética (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006).

#### 4.3.1 Biorreatores Abertos

O crescimento de microalgas em biorreatores abertos expostos aos níveis e às variações de temperatura, intensidades luminosas e duração dos ciclos claro-escuro depende destas condições presentes no local do cultivo (GRIMA et al., 1996).

Diversos estudos avaliam o potencial de regiões para o cultivo de microalgas avaliando principalmente a relação da temperatura com os parâmetros de crescimento celular (VOLTOLINA et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2003; HASE et al., 2000).

A cobertura dos cultivos por túnel de filme transparente foi avaliada por HASE et al. (2000) como alternativa de baixo investimento para reduzir os efeitos ambientais prejudiciais, com a vantagem de permitir que a luz solar atinja os cultivos.

Embora biorreatores abertos dificultem ou impossibilitem o controle de certas variáveis, como temperatura e evaporação, com influência no crescimento da microalga, sistemas abertos expostos a condições ambientais naturais são os mais utilizados para o cultivo em grande escala (BELAY, 1997), devido principalmente ao aproveitamento da energia solar e ao baixo custo e simplicidade de construção e operação (TREDICI, 2010).



(a)



(b)



(c)

FIGURA 1 Biorreatores tipo “raceway” de 5 L (a), 650 L (b) e 10 000 L (c). Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica

#### 4.3.2 Biorreatores Fechados

Os fotobiorreatores, geralmente oferecem melhores condições para controle do processo, como controle de temperatura e pH, menor evaporação, maior facilidade

para manutenção de uma cultura axênica, além de proporcionar maiores produtividades celulares (TREDICI, 2010). Estes fotobiorreatores podem ser construídos de modo a minimizar o espaço ocupado, como os fotobiorreatores tubulares horizontais e verticais, podendo ainda serem posicionados de maneira a aproveitar melhor a luz solar (TREDICI, 2010).

Biorreatores fechados são utilizados para produção de várias espécies de microalgas (NOVAKOVIC et al., 2005; PULZ, 2001; MIRON et al., 2000; GRIMA et al., 1999a; MIRON et al., 1999; CHINI ZITTELLI et al., 1999).

Um tipo de biorreator fechado que é utilizado para o cultivo de microalgas é o de bolsas plásticas (*sleeves*) que embora apresente baixo custo, necessita de uma grande área para instalação e são necessários várias unidades para uma produção em grande escala, limitando assim suas aplicação (BOROWITZKA, 1999). Segundo TREDICI et al. (2009) este tipo de fotobiorreator é utilizado por várias companhias para cultivos de algumas espécies de microalgas para produção de cosméticos, alimentos e fármacos.

Um dos fotobiorreatores mais utilizados são os tubulares pois proporcionam maior eficiência luminosa, aumentando a produtividade celular além de poderem ser utilizados *outdoor* (BOROWITZKA, 1999). Estes reatores apresentam a facilidade de aumento de escala e grandes volumes de cultura podem ser mantidos em pequenas áreas (TREDICI et al., 2009).

TREDICI et al. (2009) citam a utilização de fotobiorreatores chamados *Annular column*, que consistem em dois cilindros concêntricos e transparentes, acoplados em uma mesma base e iluminado através de lâmpadas fluorescentes localizadas dentro do cilindro interno. Nesta configuração a relação entre a área ocupada e o volume é muito alta.

Os fotobiorreatores do tipo painéis são planos e podem ser utilizados para produção de biomassa microalgal em grande escala (TREDICI et al., 2009). Estes reatores podem ser fabricados em vidro, o que o torna extremamente transparente, fácil de higienizar e resistente as intemperes do tempo, porém devido a algumas características como peso, fragilidade e custo, não são utilizados em produções comerciais de biomassa.

Com o objetivo de reduzir os custos com a fabricação do fotobiorreator e conseqüentemente, os custos de produção da biomassa microalgal, TREDICI e RODOLFI (2004) desenvolveram um fotobiorreator do tipo painel, fabricado com

plástico rígido e disposto dentro de uma estrutura metálica, que mantém a estrutura plana do sistema. Estes fotobiorreatores foram patenteados pelos autores como o nome de *Green Wall Panel* (GWP) e já são utilizados para produção comercial de biomassa.



(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 2 Fotobiorreatores tubulares horizontal (a) e vertical (b) no Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG; Fotobiorreatores *Green Wall Panel* (c) e tubulares horizontal (d) em Florença, Itália.

#### 4.4 BIOPRODUTOS

A aplicação mais comum de microalgas é na aquicultura (KOBAYASHI, et al., 2008; CHIEN e SHIAU, 2005), para alimentação direta ou indireta de peixes, moluscos e crustáceos.

Além da utilização para produção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos nutracêuticos como ácidos graxos poliinsaturados (SAJILATA et al., 2008; CARVALHO e MALCATA, 2005) e pigmentos carotenoides (CAMPO et al., 2007; MADHYASTHA e VATSALA, 2007).

Microalgas são fontes naturais de uma variedade de pigmentos, como os carotenoides e as ficobiliproteínas (TREDICI et al., 2009). Além das propriedades colorantes, os carotenoides atuam como pró vitamina A e como antioxidante, protegendo as células e os tecidos dos efeitos danosos dos radicais livres.

A clorofila é outro bioproduto obtido a partir de microalgas de grande interesse farmacêutico. Segundo SINGH e GU (2010) quando cultivadas em condições ótimas, as microalgas apresentam, em média, 4% de clorofila em sua composição (peso seco).

A concentração média de carotenoides nas microalgas varia entre 0,1 a 2%, porém a microalga *Dunaliella* quando cultivada em alta salinidade e alta intensidade luminosa pode produzir biomassa com até 14% de  $\beta$ -caroteno (MILLEDGE, 2011).

A astaxantina é outro carotenoide que pode ser extraído a partir de microalgas e sua maior aplicação é na alimentação de peixes em cativeiro, suplementação alimentar e como antioxidante (MILLEDGE, 2011).

Atualmente a aplicação mais estudada da biomassa microalgal é na produção de biocombustíveis, com destaque para a produção de biodiesel (SINGH e GU, 2010). Essa utilização da biomassa como fonte de biodiesel se dá principalmente por vantagens como, a microalga mantém seu crescimento independente das estações do ano e da qualidade do solo, necessita menos água e menos área que fontes tradicionais de biodiesel e apresenta elevada produtividade lipídica. A produção de biodiesel a partir de microalgas pode chegar a  $58.700 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ , valor este bem superior quando comparado com biodiesel a partir da semente de canola,  $1.190 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  (SINGH e GU, 2010).

Outras aplicações dos bioprodutos sintetizados a partir de microalgas estão apresentados na Tabela 2.



TABELA 2 Aplicação de bioprodutos sintetizados por microalgas

	<b>Produto</b>	<b>Aplicações</b>
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura
Corantes e antioxidantes	Xantofilas (astaxantina e cantaxantina)	
	Luteína	Aditivos alimentares
	βcaroteno Vitamina C e E	Cosméticos
Ácidos graxos	Ácido araquidônico - ARA	
	Ácido eicosapentaenoico - EPA	
	Ácido docosahexaenoico - DHA	Aditivos alimentares
	Ácido gama-linolênico - GCA	
	Ácido linoleico - LA	
Enzimas	Superóxido dismutase – SOD	Alimentos naturais
	Fosfoglicerato quinase – PGK	Pesquisa
	Luciferase e Luciferina	Medicina
	Enzimas de restrição	
Polímeros	Polissacarídeos	Aditivos alimentares
	Amido	Cosméticos
	Ácido poli-beta-hidroxi-butírico - PHB	Medicina
	Peptídeos	
Produtos especiais	Toxinas	
	Isótopos	Pesquisa
	Aminoácidos	Medicina
	Esteróis	

\*Adaptado de DERNER et al. (2006)

#### 4.4.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são compostos formados por cadeias de átomos de carbono ligados a hidrogênio, presentes em gorduras e óleos. Podem ser classificados de acordo com o tamanho (curta, média, longa) ou com o tipo de ligação da cadeia hidrocarbonada (saturados, mono e poliinsaturados).

Tanto humanos como animais necessitam de enzimas específicas para sintetizar ácidos graxos de cadeia com mais de 18 carbonos, portanto, devem ser adicionados à dieta (TREDICI et al., 2009).

Segundo SIMOPOULOS (2002) a procura por fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) iniciou devido às mudanças na dieta humana e ao acentuado surgimento de doenças cardiovasculares relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como a sua reconhecida importância terapêutica, especialmente os ácidos graxos da família  $\omega$ -3.

A produção de ácidos graxos poliinsaturados tem recebido crescente interesse, devido principalmente aos efeitos fisiológicos nos humanos, como a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (SINGH e GU, 2010; SIMOPOULOS, 2002).

Os peixes marinhos são uma conhecida fonte de ácidos graxos. Entretanto, existem consideráveis evidências indicando que os ácidos graxos poliinsaturados encontrados nos óleos de peixes provêm da ingestão de organismos que constituem o zooplâncton, os quais têm as microalgas como seu principal alimento. Desta maneira, por meio da cadeia trófica, os PUFA sintetizados e acumulados pelas microalgas são direcionados até os peixes (MEDINA et al., 1998).

Além disso, os lipídios extraídos de pescado apresentam algumas características indesejáveis como odor desagradável, contaminação com metais pesados, presença de colesterol e apresentam composição complexa de ácidos graxos. Os lipídios extraídos de microalgas, ao contrário, não apresentam odor desagradável, colesterol e a produção pode ser controlada através da manutenção das condições de cultivo (GRIMA et al., 1999b).

A obtenção de ácidos graxos poliinsaturados a partir de culturas de microalgas representa uma fonte alternativa de produção desta classe de lipídios, bem como, também proporciona uma série de vantagens quando comparada com fontes convencionais de obtenção destas substâncias (GANUZA et al., 2008; CHEN et al., 2007; WARD e SINGH, 2005; MEDINA et al., 1998)

O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85%. Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos

graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (DERNER et al. 2006).

Segundo HEMAISWARYA et al. (2011) os PUFAs derivados de microalgas, como os ácidos docosahexaenoico (DHA), eicopentaenoico (EPA),  $\alpha$ -linoleico (ALA) e araquidônico (AA), são essenciais para várias espécies de peixes ainda na fase larval.

O EPA é um ácido graxo da família  $\omega$ -3 e desenvolve papel importante em animais superiores como precursor dos compostos eicosanoides que são hormônios que incluem as prostaglandinas, e que são fundamentais no desenvolvimento fisiológico (HEMAISWARYA et al., 2011).

As microalgas recebem crescente interesse em sua produção, principalmente pelo fato desta consumir  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono, podendo este estar sendo gerado pela queima de combustíveis fósseis, e sua biomassa ainda ser utilizada na produção de biocombustíveis, como o biodiesel (KUMAR et al., 2010). Segundo KUMAR et al. (2010) a produção de biodiesel por microalgas se faz mais atrativa pela facilidade destas sintetizarem lipídios, o grande número de fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas e ainda a produtividade lipídica ser mais elevada do que outras fontes tradicionais de biodiesel.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.R.; COSTA, J.A.V. (2007) Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264, 130–134.
- BELAY, A. (1997) Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. London: Taylor e Francis.
- BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. (1991) High internal pH conveys ammonium resistance in *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 38, 167-169.
- BINAGHI, L.; BORGHI, A.D.; LODI, A.; CONVERTI, A.; BORGHI, M.D. (2003) Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 38, 1341–1346.
- BOROWITZKA, M.A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, 313-321.
- CAMPO, J.A.; GONZÁLEZ, M.G.; GUERRERO, M.G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1163–1174.
- CARVALHO, A.P.; MALCATA, F.X. (2005) Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: Crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology*, 7, 381-388.
- CHEN, F.; ZHANG, Y. (1997) High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 221-224.
- CHEN, G.Q.; JIANG, Y.; CHEN, F. (2007) Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry* 104, 1580–1585.
- CHIEN, Y.H.; SHIAU, W.C. (2005) The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318, 201-211.

CHINI ZITTELLI, G.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M.R. (1999) Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 70, 299–312.

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

CHISTI, Y. (2007b) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26, 126-131.

COSTA, J.A.V.; RADMANN, E.M.; CERQUEIRA, V.S.; SANTOS, G.C.; CALHEIROS, M.N. (2006) Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição*, 17, 429-436.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.F. (2004) Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92, 237–241.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.F. (2003) *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Z. Naturforsch*, 58, 76–80.

COSTA, J.A.V.; COZZA, K.L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. (2001) Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 439-442.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. (2002) An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23, 261–269.

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

FOX, R.D. (1996) *Spirulina* Production e Potencial. France: Edisud, 232 p.

GANUZA, E.; BENÍTEZ-SANTANA, T.; ATALAH, E.; VEGA-ORELLANA, O.; GANGA, R.; IZQUIERDO, M.S. (2008) *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*, 277, 109–116.

GOLDMAN, J.C. (1980) Outdoor algal mass cultures – II. Photosynthetic yield limitations. *Algal Biomass*, 11, 119-135.

GOUVEIA, L.; CHOUBERT, G.; GOMES, E.; REMA, P.; EMPIS, J. (1998) Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue. *Aquaculture International* 6, 269–279.

GRIMA, E.M.; FERNANDEZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. (1999a) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70, 231–247.

GRIMA, E.M.; MEDINA, A.R.; GIMENEZ, A.G. (1999b) Recovery of algal PUFAs. In: COHEN, Z. *Chemicals from Microalgae*. London: Taylor e Francis.

GRIMA, E.M.; SEVILLA, J.M.F.; PÉREZ, J.A.S.; CAMACHO, F.G. (1996) A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59–69.

GRINSTEAD, G.S.; TOKACH, M.D.; DRITZ, S.S.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J.L. (2000) Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 83, 237-247.

GUEDES, A.C.; AMARO, H.M.; MALCATA, F.X. (2011) Microalgae as source of high added-value compounds – A brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27, 597-613.

HASE, R.; OIKAWA, O.; SASAO, C.; MORITA, M.; WATANABE, Y. (2000) Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai City. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 157–163.

HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; KUMAR, R.R.; GANESAN, V.; ANBAZHAGAN, C. (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1737-1746.

HOSAKA, K.; HIOKI, T.; FURUUNE, H.; TANISHITA, K. (1995) Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Energy Conversion Management*, 36, 725–728.

JIMÉNEZ, C.; COSSIO, B.; LABELLA, D.; NIELL, F.X. (2003) The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. *Aquaculture*, 217, 179–190.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. (1990) Algal Nutrition. . In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press.

KHOEYI, Z.A.; SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z. (2012) Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20, 41–49.

KOBAYASHI, T.; NAGASE, T.; HINO, A.; TAKEUCHI, T. (2008) Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* in a continuous culture. *Fisheries Science*, 74, 649–656.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F.X.; LANGENHOVE, H. (2010) Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28, 371-380.

LIPS, S.H.; AVISSAR, Y.J. (1990) Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press.

MARQUEZ, F.J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAP, S. (1993) Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, 408-410.

MADHYASTHA, H.K.; VATSALA, T.M. (2007) Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular Engineering*, 24, 301–305.

MAHBOOB, S.; RAUF, A.; ASHRAF, M.; SULTANA, T.; SULTANA, S.; JABEEN, F.; RAJOKA, M.I.; AL-BALAWI, H.F.A.; AL-GHANIM, K.A. (2012) High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture International*, 20, 455–466.

MEDINA, A.R.; GRIMA, E.M.; GIMENEZ, A.G.; GONZALEZ, M.J.I. (1998) Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 16, 517-580.

MENDIOLA, J.A.; MARTÍNEZ, D.G.; RUPÉREZ, F.J.; ÁLVAREZ, P.J.M.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; BARBAS, C.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F.J. (2008) Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *Journal of Supercritical Fluids* 43, 484–489.

MILLEDGE, J.J. (2011) Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Environmental Science e Biotechnology*, 10, 31-41.

MIRÓN, A.S.; CAMACHO, F.G.; GOMEZ, A.C.; GRIMA, E.M.; CHISTI, Y. (2000) Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture. *AIChE Journal*, 46, 1872-1887.

MIRÓN, A.S.; GOMEZ, A.C.; CAMACHO, F.G.; GRIMA, E.M.; CHISTI, Y. (1999) Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, 70, 249–270.

MORAIS, M.G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J.A.V.; WENDORFF, J. (2010) Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina (Arthrospira)*. *Bioresource Technology*, 101, 2872–2876.

MORAIS, M.G.; RADMANN, E.M.; ANDRADE, M.R.; TEIXEIRA, G.G.; BRUSCH, L.R.F.; COSTA, J.A.V. (2009) Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. *Aquaculture*, 294, 60–64.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. (2008) Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. *Ciência e Agrotecnologia*, 32, 1245-1251.

MORAIS, M.G.; REICHERT, C.C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A.J.; MARINS, L.F.; COSTA, J.A.V. (2008) Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 63, 144-150.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. (2007a) Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters*, 29, 1349-1352.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. (2007b) Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129, 439–445.



MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. (2007c) Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management* 48, 2169–2173.

MORAIS, M.G.; MIRANDA, M.Z.; COSTA, J.A.V. (2006) Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físicoquímicas, sensoriais e digestibilidade. *Alimentos e Nutrição*, 17, 323-328.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, 40, 2799–2815.

MURADYAN, E.A.; KLYACHKO-GURVICH, G.L.; TSOGLIN, L.N.; SERGEYENKO, T.V.; PRONINA, N.A. (2004) Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO<sub>2</sub> concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 53–62.

NATRAH, F.M.I.; YUSOFF, F.M.; SHARIFF, M.; ABAS, F.; MARIANA, N.S. (2007) Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*, 19, 711-718.

NOVAKOVIC, G.V.; KIM, Y.; WU, X.; BERZIN, I.; MERCHUK, J.C. (2005) Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44, 6154-6163.

OGBONDA, K.H.; AMINIGO, R.E.; ABU, G.O. (2007) Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 98, 2207–2211.

OGBONNA, J.C., TANAKA, H. (1998) Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. *Bioresource Technology*, 65, 65–72.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; MADHUSUDHAN, M.C.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. (2008) Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 15, 7393-7396.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; AKBARSHA, M.A.; THAJUDDIN, N. (2012) Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a

dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 37, 60-66.

PULZ, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 287–293.

RADMANN, E.M.; CAMERINI, F.V.; SANTOS, T.D.; COSTA, J.A.V. (2011) Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management*, 52, 3132–3136.

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

RADMANN, E.M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. (2007) Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118–126.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. (2012) Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1495–1503.

REICHERT, C.C.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. (2006) Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, 23–28.

RICHMOND, A. (1990) Cell response to environmental factors. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press.

RORRER, G.L.; CHENEY, D.P. (2004) Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering*, 32, 11-41.

ROSA, A.P.C.; CARVALHO, L.F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J.A.V. (2011) Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52, 3071-3073.

SAJILATA, M.G.; SINGHAL, R.S.; KAMAT, M.Y. (2008) Fractionation of lipids and purification of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 109, 580–586.

SAKAI, N., SAKAMOTO, Y., KISHIMOTO, N., CHIHARA, M., KARUBE, I. (1995) *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO<sub>2</sub>. *Energy Conversion Management*, 16, 693–696.

SÁNCHEZ, S.; MARTINEZ, M.E.; ESPINOLA, F. (2000) Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 13–18.

SATYANARAYANA, K.G.; MARIANO, A.B.; VARGAS, J.V.C. (2011) A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, 35, 291-311.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (2001) *Biotecnologia Industrial vol.2*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA.

SCRAGG, A.H.; MORRISON, J.; SHALES, S.W. (2003) The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 884–889.

SCRAGG, A.H.; ILLMAN, A.M.; CARDEN, A.; SHALES, S.W. (2002) Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23, 67–73.

SIMOPOULOS, A.P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedecine e Pharmacotherapy*, 56, 365-379.

SINGH, J.; GU, S. (2010) Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 2596-2610.

SOEDER, C.J. (1990) An historical outline of applied alcology. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; CONVERTI, A. (2005) Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217–224.

SUKENIK, A. (1999) Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: COHEN, Z. *Chemicals from Microalgae*. London: Taylor e Francis.

- TREDICI, M.R. (2010) Photobiology of microalgae mass cultures. *Biofuels*, 1, 143-162.
- TREDICI, M.R.; BIONDI, N.; PONIS, E.; RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G. (2009) Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In: BURNELL, G.; ALLAN, G. *New technologies in aquaculture*. New York, CRC Press.
- TREDICI, M.R.; RODOLFI, L. (2004) Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. Patent WO 2004/074423-A2 (to Università degli Studi di Firenze).
- TREDICI, M.R.; CHINI ZITTELLI, G. (1998) Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 187-197.
- VARFOLOMEEV, S.D.; WASSERMAN, L.A. (2011) Microalgae as source of biofuel, food, fodder and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 789-807.
- VOLTOLINA, D.; SAAVEDRA, M.P.S.; RODRÍGUEZ, L.M.T. (2008) Outdoor mass microalgae production in Bahia Kino, Sonora, NW Mexico. *Aquacultural Engineering*, 38, 93-96.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. (1997) *Physiology, Cell-biology and Biotechnology*, London: Taylor e Francis.
- VONSHAK, A.; RICHMOND, A. (1988) Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*, 15, 233–247.
- VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. (1982) Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175–185.
- WAGENEN, J.V.; MILLER, T.W.; HOBBS, S.; HOOK, P.; CROWE, B.; HUESEMANN, M. (2012) Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5, 731-740
- WARD, O.P.; SINGH, A. (2005) Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, 3627–3652.
- WEN, Z.Y.; CHEN, F. (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21, 273-294.

### **CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

O presente trabalho foi desenvolvido em três etapas, em que foram elaborados 3 artigos:

ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA *Tetraselmis suecica* F&M-M33

ARTIGO 2 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* E *Chlorella kessleri* EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

## AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA *Tetraselmis suecica* F&M-M33

Ana Priscila Centeno da Rosa<sup>1</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.  
Fax: +55(53)3233-8745. E-mail: jorge@pq.cnpq.br

### RESUMO

A busca por fontes alternativas de compostos com alto valor nutricional tem aumentado o interesse na produção de microalgas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da atenuação da luz na produtividade e composição da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 cultivada *outdoor* em fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel*. A produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 foi influenciada pela concentração celular mantida nos cultivos bem como pela radiação solar incidida. Quando os ensaios foram realizados em fotobiorreatores inclinados, a produtividade máxima foi 0,96 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto que para os ensaios realizados em GWP verticais, dispostos paralelamente, a produtividade máxima foi 0,45 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. As máximas concentrações proteicas (49,87 a 51,01%) e lipídicas (22,03 a 23,36%) foram obtidas quando a microalga foi cultivada nos fotobiorreatores verticais e dispostos paralelamente sem interferência de sombreamento nas laterais.

**Palavras-chave:** composição, fotobiorreatores, microalga, semicontínuo.

### ABSTRACT

The search for alternative high value biocompounds has led to an increasing interest in microalgae production. The objective of this work was to evaluate the influence of light mitigation in *Tetraselmis suecica* F&M-M33 microalga production and composition cultivated outdoor in Green Wall Panel photobioreactor. The productivity of microalgae was influenced by cell concentration in the cultures and by solar radiation. When the cultures were carried out in inclined photobioreactor the productivity achieved maximum values of 0.96 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, while that for the cultures were carried out in vertical GWP arranged in parallel, the maximum productivity achieved was 0.45 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Maximum protein (49.87 a 51.01%) and lipid (22.03 a 23.36%) concentrations were obtained in cultures with vertical photobioreactors arranged in parallel, avoiding shadow interference among themselves.

**Key-words:** composition, microalgae, photobioreactor, semicontinuous.

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos, na maioria, fotossintetizantes que apresentam clorofila *a* e são responsáveis por mais de 90% da fotossíntese realizada nos oceanos (LOURENÇO, 2006). A microalga *Tetraselmis* é utilizada na aquicultura como alimento para moluscos, camarões e rotíferos (CHINI ZITTELLI et al., 2006, ROBERT et al., 2011). O gênero *Tetraselmis* apresenta elevado potencial antimicrobiano (AUSTIN e DAY, 1990; AUSTIN et al, 1992) e elevada concentração de vitamina E (CARBALLO-CÁRDENAS et al., 2003).

A produção comercial de biomassa microalgal pode ser realizada em biorreatores abertos, porém o principal problema destes cultivos é a contaminação das culturas. Uma alternativa para a produção comercial de microalgas são os cultivos em sistemas fechados, que também utilizam a luz solar como fonte de energia luminosa. Este processo aumenta o interesse na produção desta biomassa para utilização como fonte de biocompostos de alto valor nutricional e mais recentemente, para a produção de biocombustíveis.

A produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal tem recebido crescente interesse devido à elevada concentração de lipídios, podendo alcançar 77% da massa seca da biomassa (CHISTI, 2007). As microalgas do gênero *Tetraselmis* estão entre as melhores produtoras de biomassa, apresentando elevado potencial para produção de biodiesel (RODOLFI et al., 2008; CHINI ZITTELLI et al., 2006) com produtividade lipídica de até 75 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (BONDIOLI et al., 2012).

Diversos estudos tem sido realizados com o objetivo de otimizar a produção de biodiesel a partir de microalgas (PRAVEENKUMAR et al., 2012; AMARO et al., 2011; AMER et al., 2011). Para produção de biocombustíveis e/ou biocompostos de alto valor comercial, são necessárias algumas estratégias para diminuir o custo de produção da biomassa como, aumentar a produtividade, utilizar fontes alternativas de nutrientes no meio de cultivo e reduzir as demandas de energia para o cultivo (BONDIOLI et al., 2012).

A intensidade luminosa e o comprimento de onda da fonte de iluminação influenciam diretamente no crescimento de microalgas. Os cloroplastos, responsáveis

pela fotossíntese, podem ser irreversivelmente destruídos a altas intensidades de luz ultravioleta, por longos períodos de tempo (LIPS & AVISSAR, 1990).

Níveis extremos de iluminância no cultivo de microalgas podem conduzir a fotoinibição, que ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin (GRIMA et al., 1996). Porém, a fotolimitação também pode ser prejudicial ao crescimento das microalgas, que pode ocorrer pela baixa iluminância ou pela alta concentração de células no cultivo, que provocam um sombreamento em algumas células.

As limitações que a intensidade luminosa pode provocar no crescimento de microalgas justifica os estudos desta variável. Para cultivos *outdoor*, em que não é possível controlar esta variável, pode ser realizada a atenuação da intensidade luminosa, por meio da variação da concentração celular no fotobiorreator.

A produtividade em cultivos microalgais também é influenciada pela configuração do fotobiorreator e pela distância entre estes. Além disto pode ser significativamente reduzida em produções de biomassa em grande escala quando comparada às produtividades em fotobiorreatores isolados e não sombreados (CHINI ZITTELLI et al., 2006).

Diante do contexto, este trabalho objetivou o estudo da influência da atenuação da luz na produtividade e composição da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 cultivada *outdoor* em fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Micro-organismo e Meio de cultivo**

Neste estudo foi utilizada a microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 pertencente à coleção de cultura do Departamento de Biologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (Itália), mantida e cultivada em Meio F (GUILLARD e RYTHER, 1962), preparado com água do mar artificial com salinidade de 30 g.L<sup>-1</sup>.

### **2.2 Condições de Cultivo**

A microalga *T. suecica* F&M-M33 foi cultivada em sistema *outdoor* durante o verão no *Istituto per lo Studio degli Ecosistemi* (Sesto Fiorentino, Itália; 43° 49' 6"N e



11° 12' 9"L), em fotobiorreatores do tipo *Green Wall Panel* (GWP) (TREDICI e RODOLFI, 2004), com volume de 11 a 14 L, com dimensões de aproximadamente 0,65 m de altura e 0,53 m de largura.

Os cultivos foram com controle de pH (7,7) e temperatura (26°C). O pH foi controlado por meio da adição de CO<sub>2</sub> nas culturas, sendo este misturado com o ar. A mistura de ar e CO<sub>2</sub> foi injetada a uma vazão de 8 L.min<sup>-1</sup> somente durante o período claro. A temperatura foi mantida por meio da injeção de água na superfície externa dos fotobiorreatores.

O estudo do efeito da atenuação da luz nos fotobiorreatores GWP foi realizado em três diferentes condições: (i) efeito do sombreamento em três fotobiorreatores verticais dispostos paralelamente; (ii) comparação entre a configuração vertical e inclinado para o sul, dispostos isoladamente, sem sombreamento; (iii) comparação entre as configurações vertical, inclinado para o sul e inclinado para o norte, também dispostos isoladamente e sem sombreamento.

### **2.2.1 Efeito do sombreamento em GWP verticais**

Os ensaios foram realizados simulando um cultivo de microalgas em espaço reduzido, com interferência de sombreamento provocado pelos próprios fotobiorreatores e por superfícies do tipo painéis que limitavam o espaço de cultivo e simulando outros fotobiorreatores. Os fotobiorreatores do tipo GWP foram dispostos vertical e paralelamente com uma distância de 0,25 m entre cada GWP e dispostos de maneira que ficassem orientados para o sul, para melhor aproveitamento da luz solar. Nesta condição foram realizadas três configurações desta superfície que limitava o espaço dos fotobiorreatores, para estudo do efeito do sombreamento na produtividade celular.

#### **2.2.1.1 GWP Limitados por superfície externa**

Nesta configuração foi utilizada uma estrutura limitando o espaço dos fotobiorreatores (Figura 1), com todas as laterais de mesma altura dos fotobiorreatores. Foram realizados ensaios semicontínuos com taxa de renovação diária de 5, 20 e 40%. No ensaio com taxa de renovação diária de 5%, a cada 3 ou 4 dias foram realizadas diluições de 40% do volume total do fotobiorreator.

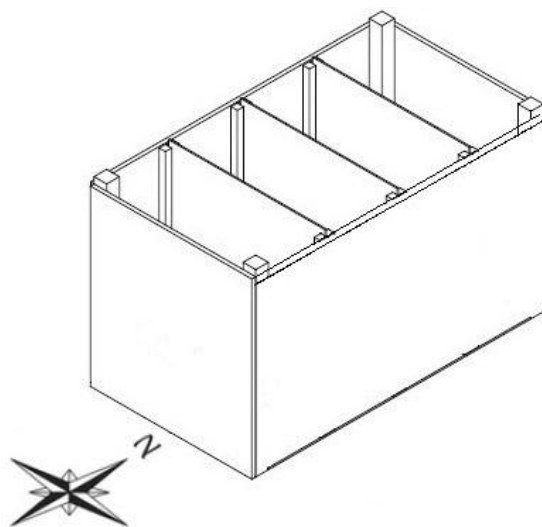


FIGURA 1 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* dispostos paralelamente e limitados por superfície fechada.

#### 2.2.1.2 GWP Sem interferência das laterais leste e oeste

Nesta condição foram retiradas as laterais leste e oeste da estrutura que limitava o espaço dos fotobiorreatores, restando somente a interferência de sombreamento nos lados norte e sul (Figura 2). Para esta configuração foram realizados ensaios semicontínuos com taxa de renovação diária de 5, 20 e 40%. Para o ensaio com taxa de renovação diária de 5%, a cada três ou quatro dias foram realizadas diluições de 40% do volume total do fotobiorreator.

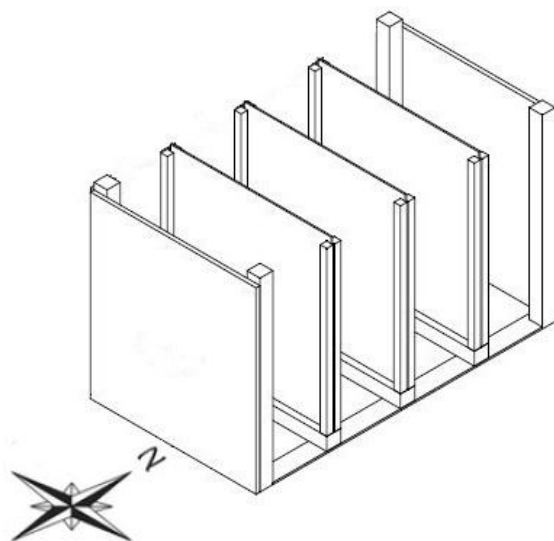


FIGURA 2 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* dispostos paralelamente e sem interferência das laterais leste e oeste.

### 2.2.1.3 Simulação de uma planta de produção de microalgas em GWP

Para esta simulação foram colocados painéis verdes, de mesmas dimensões dos fotobiorreatores, dispostos paralelamente, representando outros fotobiorreatores (Figura 3). Nesta condição foram realizados ensaios semicontínuos com taxa de renovação diária de 5 e 20% assim como nos ensaios anteriores. Também foram realizadas diluições de 40% do volume total do fotobiorreator no ensaio com taxa de renovação diária de 5%.

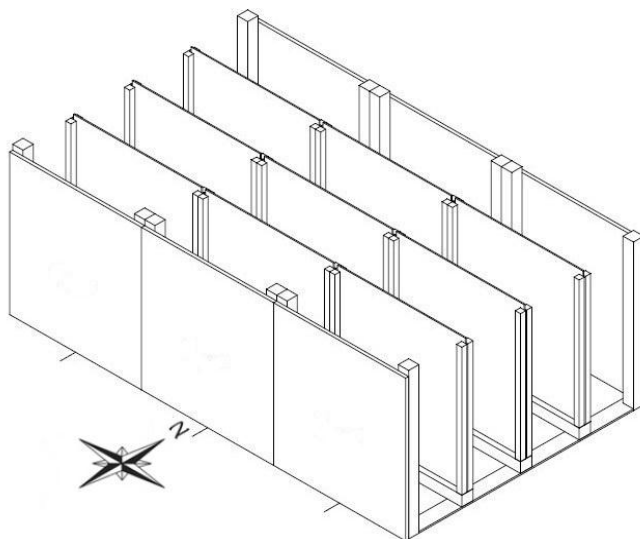


FIGURA 3 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* dispostos paralelamente simulando uma planta de produção de microalgas.

### 2.2.2 GWP vertical e inclinado para o sul

Estes ensaios foram realizados utilizando fotobiorreatores GWP vertical (GWP-V) e inclinado ( $45^\circ$ ) orientado para o sul (GWP-IS), ambos dispostos isoladamente, sem interferência de sombreamento (Figuras 4a e 4b). Para estas configurações foram realizados cultivos semicontínuos com diluições diárias para a manutenção das seguintes condições:

- concentrações iguais ( $50 \text{ g.m}^{-2}$ );
- concentrações diferentes (GWP-V =  $50 \text{ g.m}^{-2}$  e GWP-IS =  $70 \text{ g.m}^{-2}$ ).

### 2.2.3 GWP vertical, inclinado para o sul e inclinado para o norte

Estes ensaios foram realizados utilizando fotobiorreatores GWP vertical (GWP-V), inclinado ( $45^\circ$ ) orientado para o sul (GWP-IS), e inclinado ( $45^\circ$ ) orientado

para o norte (GWP-IN), todos dispostos isoladamente, sem interferência de sombreamento (Figura 4). Para estas configurações foram realizados cultivos semicontínuos com diluições diárias para a manutenção da concentração  $50 \text{ g.m}^{-2}$ .

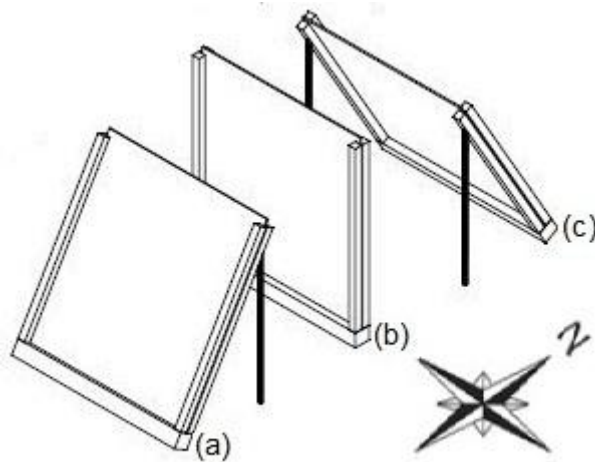


FIGURA 4 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* isolados na vertical (b), inclinado para o sul (a) e inclinado para o norte (c).

### 2.3 Determinações Analíticas

Diariamente foi determinada a concentração celular por meio da medida de massa seca (CHINI ZITTELLI et al., 2000).

Os valores de radiação solar diária foram obtidos do Laboratório de Meteorologia e Modelagem Ambiental da Toscana (La.M.M.A. - Livorno, Itália).

Ao final de cada ensaio, amostras foram recolhidas, centrifugadas, liofilizadas e armazenadas a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação de proteínas (LOWRY et al., 1951), carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e lipídios (MARSH e WEINSTEIN, 1966). A determinação de proteínas e carboidratos foi realizada a partir da biomassa sonicada.

### 2.4 Avaliação do Crescimento

Para avaliação do crescimento foi determinada, diariamente, a produtividade celular segundo a equação  $P = (X_t - X_{t-1}) \cdot t^{-1}$ , onde  $X_t$  é a concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (d).

## 2.5 Análise estatística

As concentrações de proteínas, lipídios e carboidratos foram avaliadas segundo Análise de Variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ), utilizando Teste de Tukey.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mesmo com diluições diárias da biomassa foi observado aumento na concentração celular da microalga (Figuras 6, 8, 10, 13 e 15). Isto se deve principalmente às altas intensidades luminosas e à disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo, proporcionada pelo sistema de cultivo semicontínuo, o qual permite que não haja o consumo total de nutrientes.

A concentração celular mantida no cultivo é fundamental para manutenção das taxas de crescimento, produtividade e composição bioquímica da biomassa e é mantida por meio da taxa de renovação. Isto é fundamental quando se objetiva o cultivo em escala comercial de microalgas (RICHMOND, 2004; HARTIG et al., 1988).

Segundo GO et al. (2012) as fontes de luz e nitrogênio são também fundamentais para manutenção da produtividade em cultivos fotoautotróficos. A luz fornece a fonte de energia para o crescimento das microalgas e o nitrogênio é essencial para o crescimento celular e metabolismo. O sucesso de cultivos de microalgas em grande escala depende da utilização eficiente da energia luminosa e da fonte de nitrogênio, no entanto as condições ideais da intensidade luminosa e concentração de nitrogênio variam para cada espécie.

Para os ensaios em que os fotobiorreatores foram dispostos com efeito do sombreamento de uma superfície externa a estes, a produtividade média foi 0,16; 0,14 e 0,15 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Figura 5), para os ensaios com diluições diárias de 5, 20 e 40%, respectivamente, indicando que a taxa de renovação diária não influenciou a produtividade. A média da radiação solar para este período foi 24,4 MJ.m<sup>-2</sup>.

No ensaio com taxa de renovação diária de 5% foi observada a maior ( $p < 0,05$ ) concentração de carboidratos (16,14%) (Tabela 1). Estes resultados de produtividade são semelhantes aos encontrados por GO et al. (2012) para *Tetraselmis suecica* (0,17 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) cultivada em biorreator aberto circular e sob iluminação artificial (108  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

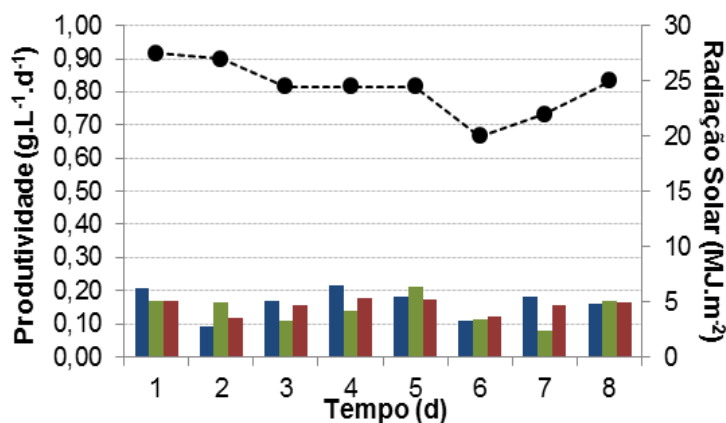


FIGURA 5 Relação entre a radiação solar (●) e produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (■), 20% (■) e 40% (■), em fotobiorreatores *Green Wall Panel* limitados por superfície externa

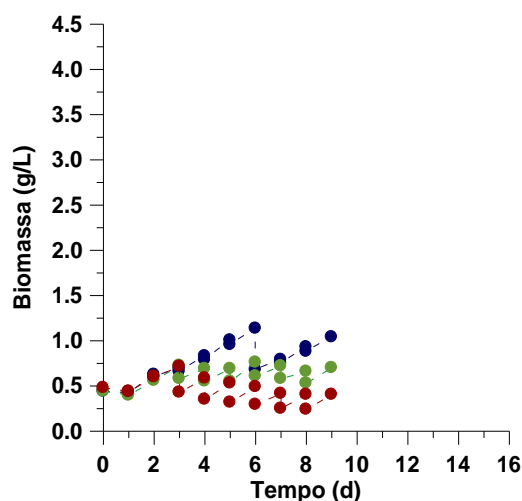


FIGURA 6 Curvas de crescimento da microalga *T. suecica* F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (●), 20% (●) e 40% (●), em fotobiorreatores *Green Wall Panel* limitados por superfície externa

Para todos os ensaios em que foi avaliado o efeito do sombreamento as produtividades apresentaram valores inferiores às observadas nos GWP isolados, porém em uma situação real de produção comercial de biomassa microalgal, essa seria a disposição dos fotobiorreatores.

Quando foram retiradas as laterais leste e oeste da superfície que delimitava a área dos GWPs, a produtividade média foi 0,32; 0,32 e 0,35 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Figura 7), para os ensaios com diluições diárias de 5, 20 e 40%, respectivamente. A taxa de

renovação diária não influenciou a produtividade nestes ensaios, porém pode ser observado aumento de mais de 100% com relação aos primeiros ensaios. A média da radiação solar para este período foi  $23,0 \text{ MJ.m}^{-2}$ . O cultivo semicontínuo com taxa de renovação diária de 40% apresentou morte celular no 10º dia, que pode ter sido causada pela alta taxa de renovação exposta, combinada com altos valores de radiação solar. Neste ensaios foi observado as maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações proteicas (49,87 a 51,01%) e lipídicas (22,03 a 23,36%) (Tabela 1).

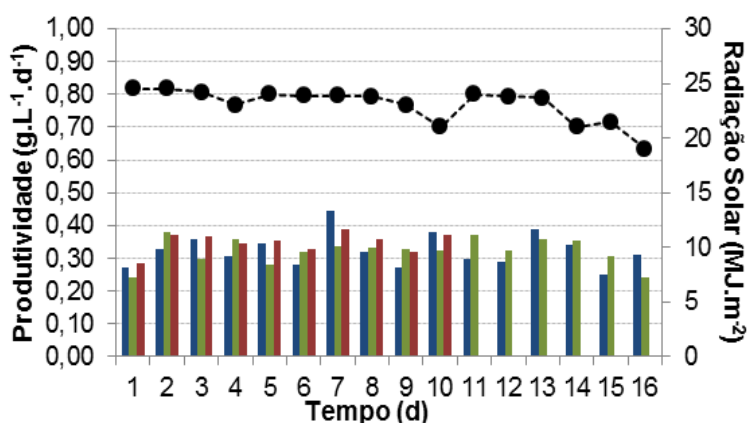


FIGURA 7 Relação entre a radiação solar (●) e produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (■), 20% (■) e 40% (■), em fotobiorreatores *Green Wall Panel* sem a interferência das laterais leste e oeste

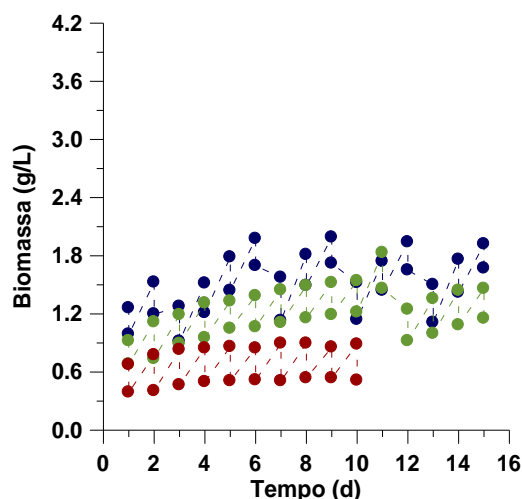


FIGURA 8 Curvas de crescimento da microalga *T. suecica* F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (●), 20% (●) e 40% (●), em fotobiorreatores *Green Wall Panel* sem a interferência das laterais leste e oeste

Os resultados obtidos na terceira etapa do estudo, em que foram colocados painéis acoplados aos GWP para simular outros fotobiorreatores, comprovam o efeito negativo do sombreamento na produtividade. Nesta configuração as produtividades médias obtidas foram 0,17 e 0,12 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Figura 9), para os ensaios com diluições diárias de 5 e 20%, respectivamente. Além do sombreamento provocado pelos painéis, a média da radiação solar foi inferior aos ensaios anteriores (18 MJ.m<sup>-2</sup>).

A simulação de uma planta de produção de microalgas, mesmo que orientada ao sul, indicado para cultivo de microalgas, causou o sombreamento dos reatores, causando redução na taxa de crescimento. O cultivo semicontínuo, mesmo com baixa taxa de renovação (20%), pode ter sido afetado pelo sombreamento além da baixa radiação solar que pode ser observada no 2º e 5º dia de experimento (Figura 9). Nesta configuração a concentração de lipídios na biomassa foi 13,93 e 13,65% para os ensaios com taxa de renovação de 5 e 20%, respectivamente.

A modificação da composição bioquímica pode ser facilmente realizada em cultivos de microalgas. Diversos estudos relatam esta modificação por meio da alteração da concentração de nutrientes no meio de cultivo (BONDIOLI et al., 2012; RECHT et al., 2012; LAWS et al., 2011; SHEN et al., 2010; LOURENÇO et al., 1997).

A microalga *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 quando cultivada *outdoor* em GWP de 590 L, simulando uma planta de produção de biomassa em grande escala,



porém sem efeito de sombreamento, apresentou produtividade máxima  $0,29 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (BONDIOLI et al., 2012).

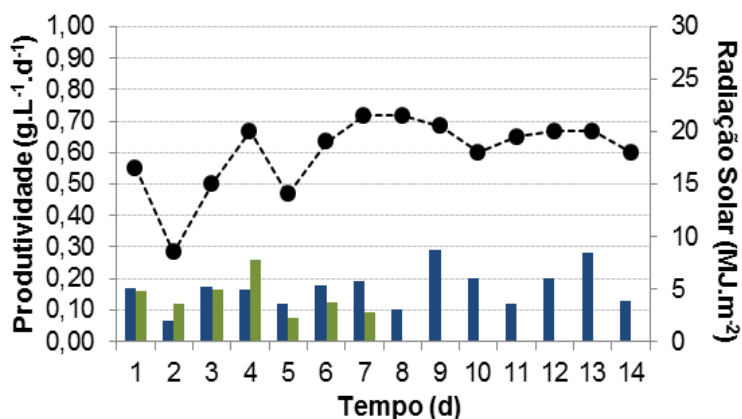


FIGURA 9 Relação entre a radiação solar (●) e produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (■) e 20% (■), simulando uma planta de produção de microalgas

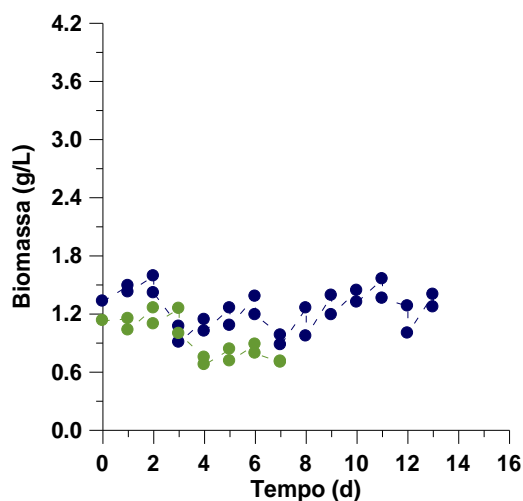


FIGURA 10 Curvas de crescimento da microalga *T. suecica* F&M-M33 nos cultivos semicontínuos com taxa de renovação diária de 5% (●) e 20% (●), simulando uma planta de produção de microalgas

A Figura 11 mostra a radiação solar e as produtividades obtidas nos ensaios realizados em GWPs isolados, em que foi mantida a concentração de  $50 \text{ g.m}^{-2}$  para os GWPs vertical e inclinado para o sul. A ausência de sombreamento nos fotobiorreatores pode ser observada pela elevada média de produtividade ( $0,61$  e  $0,67 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente).

BONDIOLI et al. (2012) cultivaram *T. suecica* F&M-M33 *outdoor* em GWP verticals de 16 L e obtiveram produtividade média  $0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e composição bioquímica (50% de proteínas, 30% de lipídios e 15% de carboidratos) similar a determinada no presente estudo.

RODOLFI et al. (2008) cultivaram *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 *outdoor* em GWP vertical com 110 L e sem efeito de sombreamento e observaram produtividade média  $0,36 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , com 32% de lipídios na biomassa.

Segundo SOEDER (1980), elevadas produtividades microalgais são obtidas quando a concentração nos cultivos é mantida entre  $50$  e  $150 \text{ g.m}^{-2}$  para melhor aproveitamento da radiação solar.

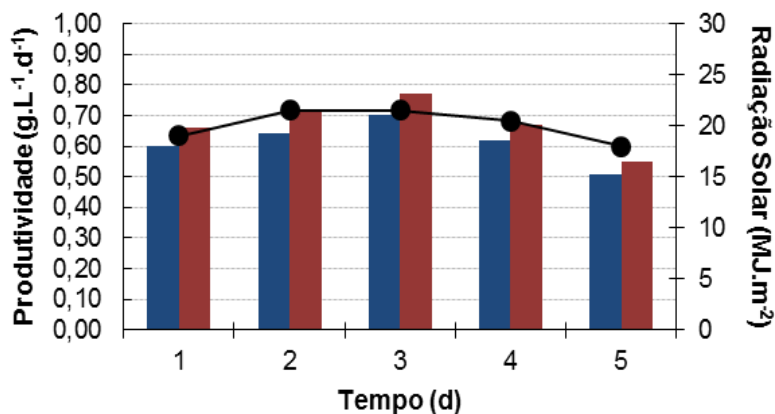


FIGURA 11 Relação entre a radiação solar (●) e produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator *Green Wall Panel* vertical (■) e *Green Wall Panel* inclinado para o sul (■) com concentrações iguais ( $50 \text{ g.m}^{-2}$ )

Para os ensaios em que foram mantidas concentrações de  $50 \text{ g.m}^{-2}$  para o GWP vertical e  $70 \text{ g.m}^{-2}$  para o GWP inclinado para o sul (Figura 12), a média de produtividade foi  $0,60$  e  $0,75 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente. Nestes ensaios pode-se observar que o cultivo realizado em GWP-IS apresentou as máximas produtividades, mesmo com concentração celular mais elevada ( $70 \text{ g.m}^{-2}$ ), devido à inclinação ótima para este tipo de fotobiorreator. Esta elevada concentração deve ser mantida nesta configuração de fotobiorreator inclinado devido à exposição solar ao qual este é submetido, evitando o fenômeno da fotoinibição. Este fenômeno pode ser observado no ensaio em que foram testadas concentrações iguais ( $50 \text{ g.m}^{-2}$ ).

Estes resultados foram superiores aos observados por CHINI ZITTELLI et al. (2006) nos cultivos *outdoor* de *T. suecica* em fotobiorreator *Annular Column* e com taxas de renovação diárias de 30, 40 e 50% (0,48; 0,51 e 0,56 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente). Nestes ensaios a composição bioquímica da biomassa obtida não apresentou diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) (41–44% de proteínas, 30–32% de lipídios e 10–13% de carboidratos).

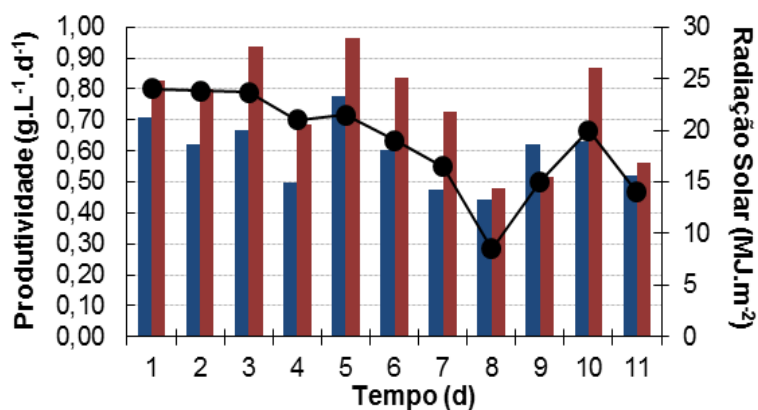


FIGURA 12 Relação entre a radiação solar (●) e produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator *Green Wall Panel* vertical (■) e *Green Wall Panel* inclinado para o sul (■) com diferentes concentrações (GWP-V: 50 g.m<sup>-2</sup>; GWP-IS: 70 g.m<sup>-2</sup>).

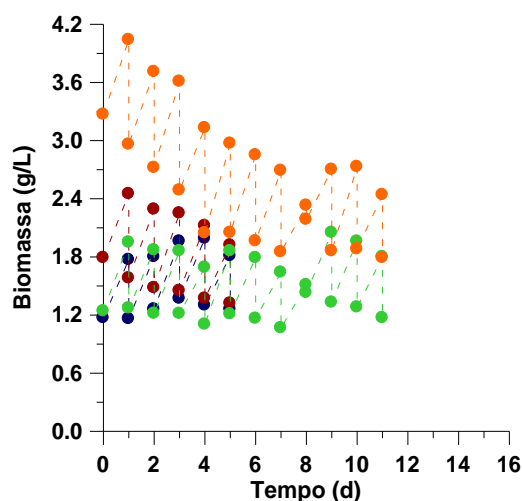


FIGURA 13 Curvas de crescimento da microalga *T. suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator *Green Wall Panel* vertical e inclinado para o sul com concentrações iguais (●: GWP-V; ●: GWP-IS) e concentrações diferentes (●: GWP-V; ●: GWP-IS)

Quando comparadas as três diferentes configurações de fotobiorreatores GWP isolados e mantidos com a mesma concentração celular ( $50 \text{ g.m}^{-2}$ ) (Figura 14), pode ser observado que a microalga cultivada em GWP-IN, manteve altas taxas de crescimento (produtividade média  $0,46 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), mesmo não estando na posição indicada para o cultivo de microalgas. A microalga cultivada no GWP-IS apresentou morte celular a partir do 4º d de cultivo, podendo ainda ser notada alterações morfológicas nas células. Isto pode ter ocorrido devido a baixa concentração celular mantida no fotobiorreator, causando fotoinibição do crescimento, mesmo com radiação solar média neste período de  $17,3 \text{ MJ.m}^{-2}$ .

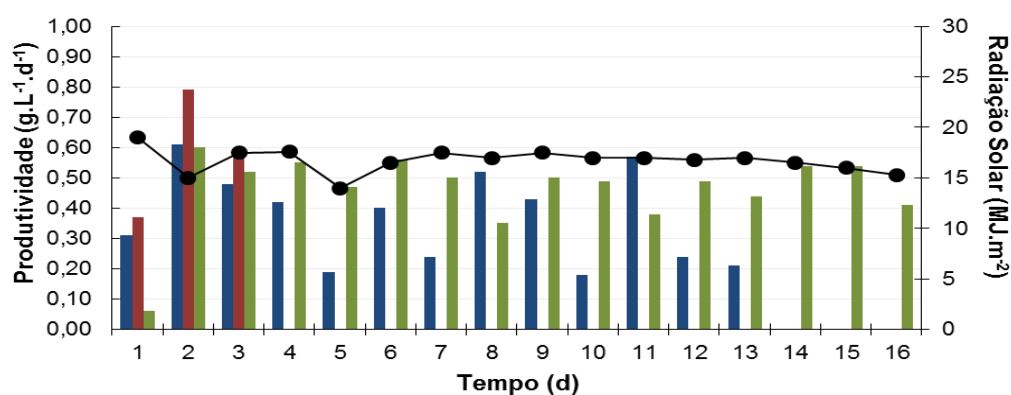


FIGURA 14 Relação entre a radiação solar (●) e produtividade da microalga *T. suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator *Green Wall Panel* vertical (■), *Green Wall Panel* inclinado para o sul (■) e *Green Wall Panel* inclinado para o norte (■)

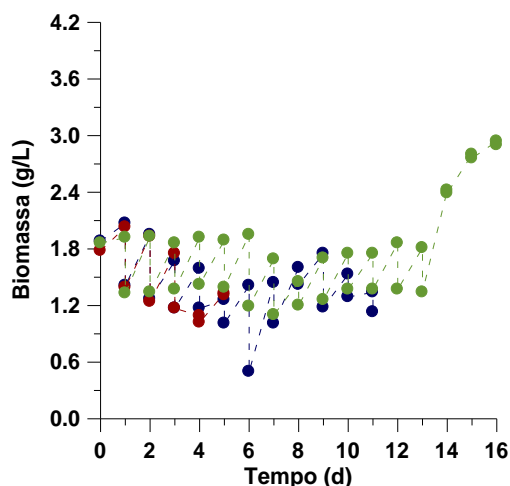


FIGURA 15 Curvas de crescimento da microalga *T. suecica* F&M-M33 cultivada em fotobiorreator *Green Wall Panel* vertical (●), *Green Wall Panel* inclinado para o sul (●) e *Green Wall Panel* inclinado para o norte (●)

A Tabela 1 apresenta as concentrações de proteínas, carboidratos e lipídios, em base seca, das biomassas obtidas ao final de cada ensaio. OTERO e FABREGAS (1997) cultivaram a microalga *Tetraselmis suecica* em modo semicontínuo e 5 diferentes taxas de renovação diária com o objetivo de avaliar a influência da taxa de renovação na composição bioquímica da microalga e observaram que o aumento na taxa de renovação provocou aumento na concentração de lipídios e proteínas da biomassa. As máximas concentrações de lipídios e proteínas foram observadas nos ensaios com taxa de renovação diária de 40%, o que está de acordo com o presente estudo. Os autores também observaram redução significativa na concentração de carboidratos, com o aumento da taxa de renovação. No presente estudo foi observada redução significativa da concentração de carboidratos somente nos primeiros ensaios, quando os GWPs foram dispostos limitados por uma superfície externa (Tabela 1).

TABELA 1 Concentração de proteínas, lipídios e carboidratos, em base seca, da microalga *T. suecica* F&M-M33

Condição		Proteína (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
GWP limitados por superfície externa	TR 5%	41,36±0,60 <sup>a</sup>	16,14±0,84 <sup>g</sup>	19,17±0,35 <sup>b,c</sup>
	TR 20%	45,16±1,30 <sup>d,e</sup>	11,64±0,37 <sup>d,e</sup>	18,81±0,35 <sup>a,b,c</sup>
	TR 40%	44,84±0,58 <sup>d,e</sup>	12,50±1,01 <sup>e,f</sup>	19,50±0,16 <sup>b,c,d</sup>
GWP sem a interferência das laterais leste e oeste	TR 5%	49,87±1,36 <sup>f</sup>	10,48±0,18 <sup>b,c,d</sup>	22,03±0,32 <sup>e,f</sup>
	TR 20%	50,14±0,81 <sup>f</sup>	9,57±0,22 <sup>a,b</sup>	22,72±0,82 <sup>f</sup>
	TR 40%	51,01±1,28 <sup>f</sup>	9,24±0,66 <sup>a,b</sup>	23,36±2,24 <sup>f</sup>
Simulação de uma planta de produção de microalgas	TR 5%	41,62±0,92 <sup>a,b</sup>	13,93±0,30 <sup>f</sup>	22,60±1,02 <sup>f</sup>
	TR 20%	42,93±0,08 <sup>a,b,c,d</sup>	13,65±0,75 <sup>f</sup>	20,90±0,45 <sup>d,e</sup>
GWP-V x GWP-IS com concentrações iguais	GWP-V	44,19±0,31 <sup>c,d,e</sup>	8,81±0,57 <sup>a</sup>	19,76±0,89 <sup>c,d</sup>
	GWP-IS	43,53±0,14 <sup>a,b,c,d,e</sup>	11,27±0,24 <sup>c,d,e</sup>	19,09±1,65 <sup>b,c</sup>
GWP-V x GWP-IS com concentrações diferentes	GWP-V	42,01±0,43 <sup>a,b,c</sup>	9,10±0,67 <sup>a,b</sup>	19,56±0,13 <sup>b,c,d</sup>
	GWP-IS	44,03±0,72 <sup>b,c,d,e</sup>	11,20±0,05 <sup>c,d,e</sup>	19,21±0,56 <sup>b,c</sup>
GWP-V x GWP-IS x GWP-IN	GWP-V	43,80±0,29 <sup>b,c,d,e</sup>	8,99±0,19 <sup>a,b</sup>	18,67±0,76 <sup>a,b,c</sup>
	GWP-IS	45,78±0,69 <sup>e</sup>	10,11±0,49 <sup>a,b,c,d</sup>	17,42±0,17 <sup>a</sup>
	GWP-IN	41,96±0,98 <sup>a,b,c</sup>	9,67±0,46 <sup>a,b,c</sup>	18,04±1,17 <sup>a,b</sup>

GWP-V: fotobiorreator *Green Wall Panel* vertical; GWP-IS: fotobiorreator *Green Wall Panel* inclinado para o sul; GWP-IN: fotobiorreator *Green Wall Panel* inclinado para o norte; TR: taxa de renovação diária. Letras iguais para cada parâmetro químico: não apresentam diferença significativa entre as médias ( $p \geq 0,05$ ).

A Figura 16 mostra a variação diurna da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) incidida nas faces sul dos fotobiorreatores em um dia típico do período em que foram realizados todos os ensaios, bem como a incidência em uma superfície horizontal.

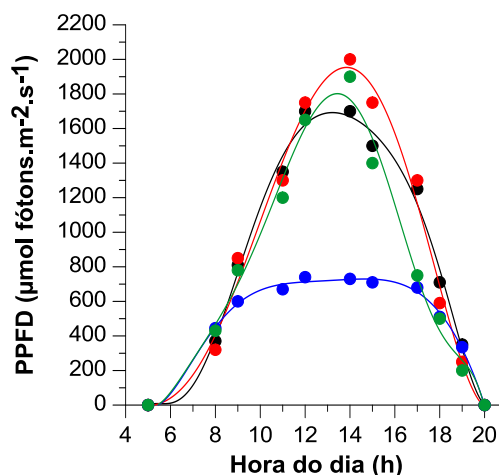


FIGURA 16 Variação diurna da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) incidida nas faces sul dos fotobiorreatores GWP-V (●), GWP-IS (●), GWP-IN (●) e superfície horizontal (●)

#### 4 CONCLUSÃO

A produtividade da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 foi influenciada pela concentração celular mantida nos cultivos, disposição dos fotobiorreatores e pela radiação solar incidida. Quando os ensaios foram realizados em fotobiorreatores inclinados, a produtividade média foi  $0,75 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , quando foi mantida concentração celular de  $70 \text{ g.m}^{-2}$ . Quando os ensaios foram realizados em GWP verticais, simulando uma planta de produção de biomassa microalgal, foi observado produtividade média  $0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ .

As máximas concentrações proteicas (49,87 a 51,01%) e lipídicas (22,03 a 23,36%) foram obtidas quando a microalga foi cultivada nos fotobiorreatores verticais e dispostos paralelamente sem interferência de sombreamento nas laterais.

A produção comercial de biomassa microalgal em fotobiorreatores do tipo GWP é projetada de maneira que não haja sombreamento entre as culturas, porém o

presente trabalho mostrou que podem ser reduzidos os custos de produção da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33, por meio da disposição dos fotobiorreatores, mantendo elevadas produtividades, porém com um número maior de fotobiorreatores por área.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido, ao Professor Mario Tredici e à Dr<sup>a</sup>. Graziella Chini Zittelli pela orientação no desenvolvimento do trabalho.

## 5 REFERÊNCIAS

- AMARO, H.M.; GUEDES, A.C.; MALCATA, F.X. (2011) Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88, 3402–3410.
- AMER, L.; ADHIKARI, B.; PELLEGRINO, J. (2011) Technoeconomic analysis of five microalgae-to-biofuels processes of varying complexity. *Bioresource Technology*, 102, 9350–9359.
- AUSTIN, B.; BAUDER, E.; STOBIE, M.B.C. (1992) Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases*, 15, 55–61.
- AUSTIN, B.; DAY, J.G. (1990). Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90, 389–392.
- BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L.; RIVOLTA, G.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; RODOLFI, L.; CASINI, D.; PRUSSI, M.; CHIARAMONTI, D.; TREDICI, M.R. (2012) Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource Technology*, 114, 567–572.
- CARBALLO-CÁRDENAS, E.C.; TUAN, P.M.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R.H. (2003) Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20, 139–147.
- CHINI ZITTELLI, G.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M.R. (2006) Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261, 932–943.

CHINI ZITTELLI, G., PASTORELLI, R., TREDICI, M.R. (2000) A modular flat panel photobioreactor (MFPP) for indoor cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *Journal of Applied Phycology*, 12, 521–526.

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

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

GO, S.; LEE, S.J.; JEONG, G.T.; KIM, S.K. (2012) Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 145–150.

GRIMA, E.M.; SEVILLA, J.M.F.; PÉREZ, J.A.S.; CAMACHO, F.G. (1996) A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59–69.

GUILLARD, R.R.L.; RYTHER, J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol*, 8, 229-239.

HARTIG, P.; GROBBELAAR, J.U.; SOEDER, C.J.; GROENEWEG, J. (1988) On the mass culture of microalgae: Areal density as an important factor for achieving maximal productivity. *Biomass*, 15, 211-221.

LAWS, E.A.; PEI, S.; BIENFANG, P.; GRANT, S. (2011) Phosphate-limited growth and uptake kinetics of the marine prasinophyte *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher. *Aquaculture*, 322-323, 117–121.

LIPS, S.H.; AVISSAR, Y.J. (1990) Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press.

LOURENÇO. S.O. (2006) *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa.

LOURENÇO. S.O.; MARQUEZ, U.M.L.; MANCINI-FILHO, J.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. (1997) Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*, 148, 153-168.



LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

MARSH, J.B.; WEINSTEIN, D.B. (1966) Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7, 574-576.

OTERO, A.; FÁBREGAS, J. (1997) Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159, 111-123.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; AKBARSHA, M.A.; THAJUDDIN, N. (2012) Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 37, 60-66.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. (2012) Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1495–1503.

RICHMOND, A. (2004) Biological principles of mass cultivation. In: Richmond, A. *Handbook of Microalgal Cultures, Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell.

ROBERT, R.; PARISI, G.; RODOLFI, L.; POLI, B.M.; TREDICI, M.R. (2001) Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 192, 333–346.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M.R. (2008) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100–112.

SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. (2010) Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1674–1684.

SOEDER, C. J. (1980) Massive cultivation of microalgae: results and prospects. *Hydrobiologia*, 72, 197-209.

TREDICI, M.R.; RODOLFI, L. (2004) Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. Patent WO 2004/074423-A2 (to Università degli Studi di Firenze).

## PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

Ana Priscila Centeno da Rosa<sup>1</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55(53)3233-8745. \*E-mail: jorge@pq.cnpq.br

### RESUMO

Devido a sua composição bioquímica, as microalgas apresentam o potencial de serem adicionadas diretamente a alimentos, ou indiretamente por meio da adição dos biocompostos produzidos pelas mesmas, com a finalidade de aumentar seu valor nutricional. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento e a produção de ácidos graxos pela microalga *Nannochloropsis oculata* em cultivos autotróficos e mixotróficos. Para ambos cultivos foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, em que foram variadas a temperatura, concentração de nitrato no meio de cultivo e fonte de carbono. Os máximos valores para o crescimento celular e produtividade foram obtidos no cultivo mixotrófico (0,64 g.L<sup>-1</sup> e 141,95 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente), quando a microalga *N. oculata* foi cultivada em meio F/2 utilizando 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose como fonte orgânica de carbono, 75 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub> e 20 °C. Para o cultivo autotrófico as máximas concentração celular e produtividade (0,62 g.L<sup>-1</sup> e 69,78 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente) foram obtidas quando a microalga foi cultivada com 1 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub> e 20 °C. Os principais ácidos graxos encontrados em ambos os cultivos foram o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1) e ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega$ -3), destacando-se o ácido palmítico (C16:0) que apresentou concentrações de 21,4 a 47% do total dos ácidos graxos analisados.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos, gás carbônico, glicose, microalga, resíduo.

### ABSTRACT

Due to its biochemical compositions, microalgae biomass may be applied directly into food products, or indirectly, by adding microalgae produced bioproducts. Both manners are realized in order to enhance the final product nutritional value. This work objective was to evaluate the growth and fatty acid production by the microalgae *Nannochloropsis oculata* in autotrophic and mixotrophic cultures. Both cultures were submitted to 2<sup>3</sup> factorial design of experiment, where the studied variables were temperature, nitrate concentration in the medium and carbon source. The highest growth rate and biomass productivity were achieved in the mixotrophic culture (0.64 g.L<sup>-1</sup> and 141.95 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectively), when the microalgae *N. oculata* was cultivated in F/2 media utilizing 1 g.L<sup>-1</sup> of glucose as carbon source, 75 mg.L<sup>-1</sup> of NO<sub>3</sub> and 20 °C. In the autotrophic culture, maximum cellular concentration and productivity

culture ( $0.62 \text{ g.L}^{-1}$  and  $69.78 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectively) were obtained when the microalgae was cultivated  $1 \text{ g.L}^{-1}$  of  $\text{NaHCO}_3$ ,  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  of  $\text{NO}_3$  and  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The main fatty acids present in the cultures were the myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 $\omega$ -3), with emphasis on C16:0, which appeared in the highest concentrations, representing 21.4 and 47% of the analyzed fatty acids.

**Key-words:** Carbon dioxide, fatty acids, glucose, microalgae, residue.

## 1 INTRODUÇÃO

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoleico (18:2 $\omega$ -6, AL) e alfa-linolênico (18:3 $\omega$ -3, AAL) são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos (MARTIN et al., 2006).

Os ácidos graxos essenciais são poliinsaturados e não são sintetizados pelas células do organismo, portanto, devem ser adicionados à dieta. Segundo SIMOPOULOS (2002) a procura por fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) iniciou devido às mudanças na dieta humana e ao acentuado surgimento de doenças cardiovasculares relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como a sua reconhecida importância terapêutica, especialmente os ácidos graxos das famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6.

A produção comercial de ácidos graxos é realizada por meio da extração de fontes vegetais como soja, linhaça e canola, e também de fontes animais como peixes. Uma fonte alternativa são as microalgas, que são micro-organismos que crescem pelo mesmo processo fotossintético adotado pelas plantas superiores, onde há conversão de água,  $\text{CO}_2$  e luz em oxigênio e biomassa (COSTA et al., 2003).

As microalgas estão sendo utilizadas como suplemento e/ou complemento alimentar humano e animal em diferentes formulações com o apelo de efeito fisiológico positivo na saúde do consumidor, pois além de apresentar elevada concentração de ácidos graxos, são fontes de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas e pigmentos (HARWOOD e GUSCHINA, 2009; VARFOLOMEEVA e WASSERMAN, 2011).

As principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas são no enriquecimento de alimentos, formulação de rações para peixes e produção de biodiesel (SPOLAORE et al., 2006; KOBERG et al., 2011).

Uma das microalgas que vem sendo estudada como fonte de ácidos graxos poliinsaturados é a *Nannochloropsis* (DAS et al., 2011; LOURENÇO et al., 2002), que é uma microalga marinha que pertence à classe das Eustigmatophyceae e é utilizada em aquicultura em decorrência da facilidade de cultivo e alta velocidade de crescimento (LOURENÇO et al., 2002).

Para proporcionar um aumento significativo na produção de lipídios e ácidos graxos a partir da microalga *Nannochloropsis*, vários fatores vêm sendo estudados, como, concentração e fonte de carbono e nitrogênio, influência da temperatura e intensidade luminosa (LIN et al., 2012; WAGENEN et al., 2012).

Diante do contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento e o perfil de ácidos graxos da microalga *Nannochloropsis oculata* em cultivos autotróficos e mixotróficos, em que foram variadas as fontes de carbono, temperatura e concentrações de  $\text{NO}_3$  no meio de cultivo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Micro-organismo e meio de cultivo**

Neste trabalho foi utilizada a microalga *Nannochloropsis oculata* (obtida da Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar, Universidade Federal Fluminense – CMEA/UFF). O meio utilizado para manutenção e cultivo da microalga foi o meio sintético F/2 (GUILLARD e RYTHER, 1962), preparado com água do mar previamente esterilizada.

### **2.2 Condições de cultivo**

Foram realizados 8 ensaios autotróficos e 8 ensaios mixotróficos de acordo com planejamento experimental fatorial  $2^3$ . Nestes ensaios foram variados, no meio de cultivo, fonte de carbono inorgânico e orgânico, temperatura e concentração de nitrato ( $\text{S}_{\text{NO}_3}$ ). Os níveis reais e codificados do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Níveis reais e codificados utilizados nos dois planejamentos experimentais.

Níveis codificados	Níveis reais			
	Fonte de Carbono		Temperatura (°C)	S <sub>NO<sub>3</sub></sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
	Cultivo Autotrófico	Cultivo Mixotrófico		
-1	CO <sub>2</sub>	Glicose	20	10
+1	NaHCO <sub>3</sub>	RIO	25	75

S<sub>NO<sub>3</sub></sub>: Concentração de nitrato no meio; RIO: Resíduo industrial de oleaginosas (28,4% sacarose; 18,6% estaquiose; 9,68% rafinose; 0,25% galactose; 0,24% glicose; 0,13% frutose).

Nos cultivos autotróficos a concentração de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) foi 1 g.L<sup>-1</sup>. O CO<sub>2</sub> foi misturado ao ar comprimido (2%<sub>v/v</sub>) e a mistura foi adicionada aos cultivos por 15 min, a cada 1 h, durante o período claro.

Para os cultivos mixotróficos a concentração de carbono orgânico foi 1 g.L<sup>-1</sup> e a fonte de carbono inorgânico utilizada nestes cultivos foi o CO<sub>2</sub> misturado ao ar comprimido (2%<sub>v/v</sub>) e adicionado aos cultivos por 15 min a cada 1 h, durante o período claro (ROSA et al., 2011).

Os ensaios tiveram a duração de 15 d e foram realizados em biorreatores tipo erlenmeyers de 2 L, com volume útil de 1,5 L, mantidos em estufa termostatizada com fotoperíodo de 12h claro/escuro e 3000 lux fornecidos por lâmpadas fluorescentes.

A concentração celular inicial utilizada foi 0,2 g.L<sup>-1</sup> e agitação contínua realizada por injeção de ar a 0,3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), equivalente a 27 L<sub>ar</sub>.h<sup>-1</sup>.

### 2.3 Determinações analíticas

A cada 24 h foram coletadas amostras para acompanhamento do pH e da concentração celular, calculada por meio da medida da densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro, com auxílio de curva de calibração relacionando densidade ótica com peso seco de biomassa. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro digital.

Ao final dos cultivos, as amostras foram centrifugadas e secas em estufa a 40 °C. Os lipídios foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por BLIGH e DYER (1959). A esterificação dos lipídios, para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos

graxos, foi realizada de acordo com o método proposto por METCALFE e SCHIMITZ (1966).

A determinação de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropil--methylpolysiloxane), com 60 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e as seguintes condições cromatográficas: hidrogênio como gás de arraste a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>; temperatura do detector = 280 °C; temperatura do injetor = 250 °C; temperatura do forno = 100 °C por 4 min, aumento de 4 °C.min<sup>-1</sup> até 200 °C permanecendo 40 min, aumento de 30 °C.min<sup>-1</sup> até 230 °C permanecendo por 10 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção das amostras com padrões (Sigma, EUA) e quantificados por normalização das áreas dos picos.

## 2.4 Avaliação do Crescimento

Para avaliação do crescimento foi determinada, para cada experimento, a produtividade celular máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ , mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) segundo a equação  $P = (X_t - X_{t-1}).t^{-1}$ , onde  $X_t$  é a concentração celular (mg.L<sup>-1</sup>) no tempo t (d).

## 2.5 Análise estatística

A concentração celular máxima, produtividade máxima e concentração de ácidos graxos, foram avaliadas segundo estimativa dos efeitos de cada variável e da interação entre estas. Os resultados apresentados são os valores médios das duplicatas com nível de 95% de confiança.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As máximas concentrações celulares e produtividades observadas nos cultivos autotróficos e mixotróficos estão apresentadas na Tabela 2.

Dentre os cultivos autotróficos, a máxima concentração celular foi observada no ensaio A5 (0,62 g.L<sup>-1</sup>) em que foi utilizado NaHCO<sub>3</sub> como fonte inorgânica de carbono, 10 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub> no meio de cultivo e cultivada a 20 °C. Neste ensaio também foi observada a máxima produtividade (69,78 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>).

TABELA 2 - Concentração celular máxima ( $X_{\text{máx}}$ , g.L<sup>-1</sup>) e produtividade máxima ( $P_{\text{máx}}$ , mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) para os cultivos autotróficos e mixotróficos da microalga *Nannochloropsis oculata*.

Ensaio	Fonte de Carbono	Temperatura (°C)	$S_{\text{NO}_3}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	Cultivos Autotróficos		Cultivos Mixotróficos	
				$X_{\text{máx}}$	$P_{\text{máx}}$	$X_{\text{máx}}$	$P_{\text{máx}}$
				1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1	0,55	62,23	0,64	141,95
3	-1	+1	-1	0,32	46,11	0,62	118,48
4	-1	+1	+1	0,25	21,67	0,37	76,63
5	+1	-1	-1	0,62	69,78	0,22	12,91
6	+1	-1	+1	0,41	39,87	0,20	0
7	+1	+1	-1	0,34	55,69	0,44	74,26
8	+1	+1	+1	0,43	46,23	0,42	57,16

Cultivos autotróficos: A1 à A8; Cultivos mixotróficos: M1 à M8;  $S_{\text{NO}_3}$ : Concentração de nitrato no meio

Para os cultivo mixotróficos, as máximas, concentração celular e produtividade foram observadas no ensaio M2 (0,64g.L<sup>-1</sup> e 141,95 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente) em que foi utilizado glicose, como fonte orgânica de carbono, 75 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub> no meio de cultivo e cultivada a 20°C.

As produtividades máximas alcançadas nos ensaios utilizando RIO (resíduo industrial de oleaginosas) como fonte de carbono foram inferiores as dos ensaios realizados com glicose (Tabela 1). Este fato pode estar associado a falta de adaptação do inóculo com RIO, que é um substrato complexo, composto por diversos açúcares.

SU et al. (2011) cultivaram a microalga *N. oculata* em condições autotróficas, utilizando uréia como fonte de nitrogênio e obtiveram concentração celular máxima de 0,65 g.L<sup>-1</sup> após 5 d de cultivo. SFORZA et al. (2012) quando utilizaram glicerol (1% p/v) como fonte orgânica de carbono, no cultivo mixotrófico de *N. salina* obtiveram concentração celular máxima de 0,43 g.L<sup>-1</sup> em um cultivo de 16 d. Os autores ainda utilizaram para o cultivo acetato de sódio (0,75% p/v), etanol (0,4% p/v) e glicerol (2% p/v) como fontes de carbono, porém estes substratos, nas concentrações utilizadas, inibiram o crescimento celular da *N. salina*. LI et al. (2011) cultivaram *Chlorella minutissima* UTEX2341, utilizando glicerina (1 g.L<sup>-1</sup>) e após 7 d de cultivo, observaram produtividade de 110 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.



Tanto para a concentração celular máxima como para a produtividade máxima, a interação entre as três variáveis, influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ), provocando um aumento de  $0,11 \text{ g.L}^{-1}$  e  $14,68 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente.

Para o cultivo autotrófico a fonte de carbono utilizada não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) nenhuma resposta analisada (Tabela 3).

A temperatura, quando analisada isoladamente, influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) as duas respostas, diminuindo a concentração celular máxima e produtividade máxima em  $0,18 \text{ g.L}^{-1}$  e  $12,64 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente, quando a microalga foi cultivada a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . CONVERTI et al. (2009) realizaram cultivo autotrófico de *N. oculata* em meio F/2 e obtiveram melhores resultados de crescimento quando esta foi cultivada a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para os cultivos mixotróficos, a produtividade máxima apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ), de  $65,030 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , quando foi utilizado RIO como fonte de carbono orgânico (Tabela 4).

A utilização do RIO como fonte de carbono também provocou redução significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração celular máxima, de  $0,18 \text{ g.L}^{-1}$ . Esta resposta também foi influenciada significativamente, assim como no cultivo autotrófico, pela interação entre as três variáveis. Quando foi utilizado os níveis mais elevados das variáveis, a  $X_{\text{máx}}$  apresentou um aumento de  $0,13 \text{ g.L}^{-1}$ .

SFORZA et al. (2012) relatam que a concentração do  $\text{CO}_2$  nos cultivos mixotróficos influencia na assimilação do carbono orgânico. Nos cultivos mixotróficos realizados por estes autores com *N. salina*, quando foi utilizando somente o  $\text{CO}_2$  atmosférico, foi observado maiores concentrações celulares do que quando adicionado 5% de  $\text{CO}_2$ .

TABELA 3 Estimativa dos efeitos das variáveis fonte de carbono, temperatura (T, °C) e concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ , mg.L<sup>-1</sup>) e de interação entre as variáveis na concentração celular máxima ( $X_{máx}$ , g.L<sup>-1</sup>) e produtividade máxima ( $P_{máx}$ , mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) dos cultivos autotróficos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p
$X_{máx}$				
Média	0,42	0,02	21,21	0,00
Fonte de Carbono	0,05	0,04	1,20	0,26
Temperatura	-0,18	0,04	-4,47	0,00
$S_{NO_3}$	-0,03	0,04	-0,68	0,51
Fonte de Carbono x Temperatura	0,05	0,04	1,19	0,27
Fonte de Carbono x $S_{NO_3}$	-0,03	0,04	-0,78	0,46
Temperatura x $S_{NO_3}$	0,04	0,04	0,91	0,38
Fonte de Carbono x Temperatura x $S_{NO_3}$	0,11	0,04	2,80	0,02
$P_{máx}$				
Média	48,75	2,00	24,39	0,00
Fonte de Carbono	8,29	4,00	2,07	0,07
Temperatura	-12,64	4,00	-3,16	0,01
$S_{NO_3}$	-12,49	4,00	-3,12	0,01
Fonte de Carbono x Temperatura	8,78	4,00	2,20	0,06
Fonte de Carbono x $S_{NO_3}$	-7,19	4,00	-1,80	0,11
Temperatura x $S_{NO_3}$	-4,46	4,00	-1,11	0,30
Fonte de Carbono x Temperatura x $S_{NO_3}$	14,68	4,00	3,67	0,01

t: valor do teste t de Student; p: significância estatística.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados resumidos das concentrações de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), poliinsaturados (PUFA) e o somatório das famílias  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , para os ensaios realizados com a microalga *N. oculata* nos cultivos autotróficos e mixotróficos.

Os principais ácidos graxos encontrados em ambos os cultivos da microalga *N. oculata* foram o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1 $\omega$ -9) e ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega$ -3). O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido graxo encontrado em maior concentração para todos

ensaios, exceto para o ensaio A4, em que a microalga foi cultivada com  $\text{CO}_2$ , 25 °C e 75  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$ . Neste ensaio, a concentração de EPA foi mais elevada (23,6 %).

TABELA 4 Estimativa dos efeitos das variáveis fonte de carbono, temperatura (T, °C) e concentração de nitrato ( $\text{S}_{\text{NO}_3}$ ,  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e de interação entre as variáveis na concentração celular máxima ( $X_{\text{máx}}$ ,  $\text{g.L}^{-1}$ ) e produtividade máxima ( $P_{\text{máx}}$ ,  $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) dos cultivos mixotróficos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p
$X_{\text{máx}}$				
Média	0,41	0,01	44,53	0,00
Fonte de Carbono	-0,18	0,02	-9,95	0,00
Temperatura	0,10	0,02	5,61	0,00
$\text{S}_{\text{NO}_3}$	-0,01	0,02	-0,41	0,69
Fonte de Carbono x Temperatura	0,12	0,02	6,57	0,00
Fonte de Carbono x $\text{S}_{\text{NO}_3}$	-0,01	0,02	-0,56	0,59
Temperatura x $\text{S}_{\text{NO}_3}$	-0,13	0,02	-6,89	0,00
Fonte de Carbono x Temperatura x $\text{S}_{\text{NO}_3}$	0,13	0,02	6,89	0,00
$P_{\text{máx}}$				
Média	68,60	7,95	8,63	0,00
Fonte de Carbono	-65,03	15,89	-4,09	0,00
Temperatura	26,07	15,89	1,64	0,14
$\text{S}_{\text{NO}_3}$	0,67	15,89	0,04	0,97
Fonte de Carbono x Temperatura	33,19	15,89	2,09	0,07
Fonte de Carbono x $\text{S}_{\text{NO}_3}$	-15,68	15,89	-0,99	0,35
Temperatura x $\text{S}_{\text{NO}_3}$	-30,15	15,89	-1,90	0,09
Fonte de Carbono x Temperatura x $\text{S}_{\text{NO}_3}$	28,05	15,89	1,76	0,11

t: valor do teste t de Student; p: significância estatística.

Para os ácidos graxos monoinsaturados palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1), as máximas concentrações (29,2% e 18,7%, respectivamente) foram observadas no ensaio A1 em que a microalga foi cultivada com 2% de  $\text{CO}_2$ , 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  e 20 °C e no ensaio A5 em que foi utilizado 1  $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  e 20 °C, respectivamente.

TABELA 5 - Concentração dos principais ácidos graxos presentes na biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada autotróficamente

Ensaio	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 $\omega$ 9 (%)	C18:2 $\omega$ 6 (%)	C20:5 $\omega$ 3 (%)	C22:6 $\omega$ 3 (%)	PUFA (%)	( $\omega$ 3+ $\omega$ 6) (%)
A1	4,41	38,05	29,23	1,17	16,54	1,07	4,89	0,46	8,26	8,15
A2	5,56	29,86	22,86	2,29	13,36	2,41	13,80	0,11	19,83	19,83
A3	5,47	30,43	18,37	3,94	13,07	3,55	13,50	0,00	20,65	20,65
A4	5,03	21,43	14,12	3,83	10,37	4,93	23,59	0,00	32,96	32,96
A5	5,05	39,63	27,78	1,28	18,73	0,98	2,60	0,00	4,78	4,64
A6	6,68	39,72	23,03	2,16	14,99	2,32	4,71	0,00	8,98	8,73
A7	6,20	39,09	23,26	2,17	15,52	1,86	5,34	0,00	9,24	9,03
A8	6,02	36,97	23,85	1,96	15,10	2,44	6,32	0,00	11,85	11,69

C14:0 – Ácido mirístico; C16:0 – Ácido palmítico; C16:1 – Ácido palmitoleico; C18:0 – Ácido esteárico; C18:1 – Ácido oleico; C18:2 – Ácido linoleico; C20:5 – Ácido eicosapentaenoico (EPA); C22:6 – Ácido docosahexaenoico (DHA). PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.

TABELA 6 – Concentração dos principais ácidos graxos presentes na biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada mixotróficamente

Ensaio	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 $\omega$ 9 (%)	C18:2 $\omega$ 6 (%)	C20:5 $\omega$ 3 (%)	C22:6 $\omega$ 3 (%)	PUFA (%)	( $\omega$ 3+ $\omega$ 6) (%)
M1	6,64	42,44	25,36	1,39	15,82	0,89	1,85	0,00	3,85	3,62
M2	6,32	41,47	26,44	1,60	13,52	1,06	2,91	0,00	5,77	5,5
M3	6,04	44,40	27,61	1,56	15,22	0,48	0,74	0,00	2,57	2,31
M4	6,53	42,98	25,22	2,37	17,41	0,63	0,68	0,00	2,46	2,24
M5	4,92	39,93	21,62	3,22	12,34	2,28	1,02	0,00	7,21	6,93
M6	2,75	27,83	11,95	5,05	9,75	3,05	25,15	0,00	33,05	33,05
M7	7,05	47,01	23,47	1,93	13,29	0,82	1,70	0,00	3,91	3,91
M8	7,06	41,42	21,26	2,52	9,44	2,46	6,98	0,00	12,38	12,21

C14:0 – Ácido mirístico; C16:0 – Ácido palmítico; C16:1 – Ácido palmitoleico; C18:0 – Ácido esteárico; C18:1 – Ácido oleico; C18:2 – Ácido linoleico; C20:5 – Ácido eicosapentaenoico (EPA); C22:6 – Ácido docosahexaenoico (DHA). PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.

FÁBREGAS et al. (2004) observaram maior concentração de ácido palmítico na biomassa de *Nannochloropsis* sp. cultivada a 25 °C. CONVERTI et al. (2009) cultivaram a *N. oculata* autotróficamente em temperaturas de 15, 20 e 25 °C, concentrações de 0,3; 0,15 e 0,075 g.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub>, meio de cultivo F/2 e também observaram maior concentração do ácido palmítico (C16:0) na biomassa para todos ensaios. LI et al. (2011) utilizaram *Chlorella minutissima* UTEX2341 cultivada com glicerina como fonte orgânica de carbono, a 25 °C e obtiveram 14,91% de ácido palmítico (C16:0) e 0,98% de ácido palmitoleico (C16:1), sendo esta última concentração inferior ao observado no presente trabalho para a *N. oculata*, que apresentou concentrações de C16:1 de 11,95 a 27,61% nos cultivos mixotróficos. SU et al. (2011), no cultivo autotrófico da microalga *Nannochloropsis oculata*, também observaram maior concentração do ácido palmítico (C16:0) e relatam que houve uma diminuição da concentração dos ácidos linolênico (C18:3) e eicosapentaenoico (EPA; 20:5) com o aumento do tempo de cultivo. COSTA et al. (2006) também observaram maiores concentrações dos ácidos palmítico e palmitoleico na biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima*, quando estas foram cultivadas em condições autotróficas entre 30 e 35°C.

Dentre os PUFA's, o ácido produzido em maior quantidade para todos os ensaios foi o EPA, alcançando a concentração de 23,6% na biomassa do ensaio A4, em que a microalga foi cultivada a 25 °C, meio F/2 com 2% de CO<sub>2</sub> e 75 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub>. Para o cultivo mixotrófico a máxima concentração de EPA (25,1%) foi observada na biomassa do ensaio M6, em que a microalga foi cultivada a 20 °C, meio F/2 com 2% de CO<sub>2</sub> e 1 g.L<sup>-1</sup> de RIO e 75 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub>. Essa elevada concentração de EPA proporcionou que as máximas concentrações de PUFA e (ω3+ω6) também fossem observadas no ensaio A4 e no ensaio M6. Esses resultados estão de acordo com HOSHIDA et al. (2005) que observaram o aumento da concentração de EPA na biomassa de *Nannochloropsis* sp., quando a concentração de CO<sub>2</sub> passou de 0,037 para 2% no cultivo.

Segundo XU et al. (2004) a assimilação de N-NO<sub>3</sub> necessita de energia e as células na fase estacionária não tem energia suficiente para esta assimilação. Este fenômeno pode ter ocorrido no início dos ensaios realizados com RIO, já que as células podem não ter conseguido assimilar o carbono do RIO, fazendo com que fosse observado baixo crescimento celular.

Segundo o mesmo autor com adição de fonte orgânica de carbono em excesso, o nitrogênio pode se tornar um limitante para o crescimento e as células assim, sintetizarem compostos com baixo teor de nitrogênio, como lipídios e carboidratos ou compostos extracelulares. Isto pode ter ocorrido no ensaio M6 em que foi observado a máxima concentração de EPA (25,1%) porém não houve crescimento celular.

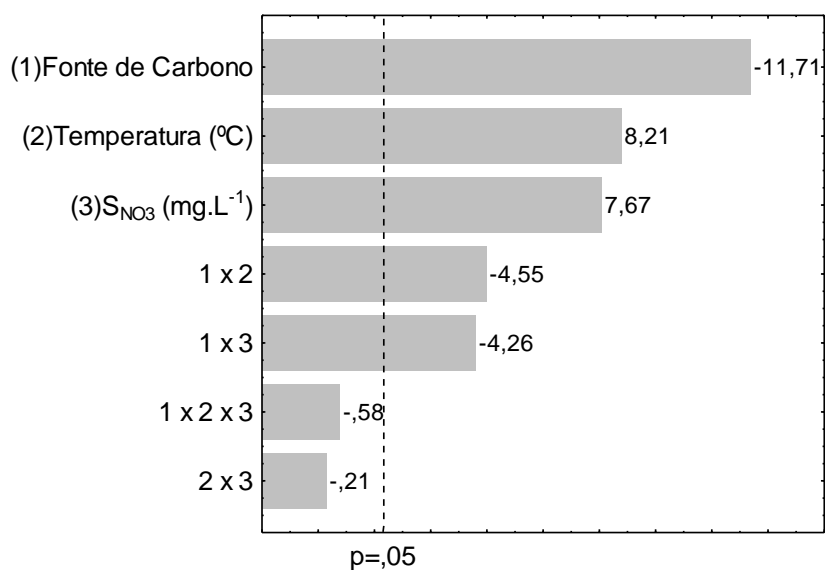
O EPA (C20:5 $\omega$ -3) é um ácido graxo essencial, importante no tratamento de doenças como arteriosclerose, câncer, artrite e Alzheimer (PULZ e GROSS, 2004). Sua produção é geralmente relatada em cultivos com eustigmatofíceas, como a *Nannochloropsis* (RECHT, 2012; WAGENEN et al., 2012; HU e GAO, 2006; HOSHIDA et al., 2005).

RADMANN e COSTA (2008) analisaram o perfil de ácidos graxos das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, cultivadas com CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO e obtiveram baixas concentrações de EPA para *S. nidulans* LEB-25 (0,10%) e *Chlorella vulgaris* LEB-106 (0,13%) e para as demais microalgas, não foi detectado este ácido graxo.

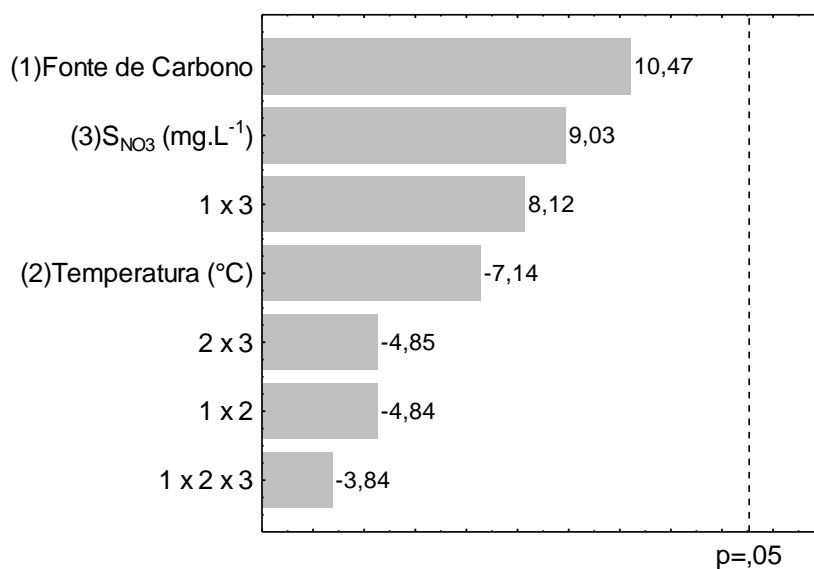
A influência das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento celular e na síntese de ácidos graxos foi comprovada por CHEN e JOHNS (1991), quando estudaram o efeito de C/N no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*. Segundo CHINI ZITTELLI et al. (1999), fatores como temperatura, intensidade luminosa e baixa concentração de nitrogênio desempenham papel fundamental na regulação da produção de ácidos graxos e principalmente na concentração de EPA.

No presente trabalho pode ser observado que as concentrações de EPA nos ensaios autotróficos foram superiores as dos ensaios mixotróficos, com exceção do ensaio M6 que apresentou 25% de EPA. CARVALHO e MALCATA (2000) testaram diferentes meios de cultivo para produção de ácidos graxos pela microalga *Pavlova lutheri*, e observaram elevada concentração de ácidos graxos saturados quando a microalga foi cultivada com meio F/2.

A Figura 1 mostra os diagramas de Pareto dos efeitos das variáveis fonte de carbono, temperatura e concentração de NO<sub>3</sub>, na concentração de PUFA para os dois planejamentos experimentais realizados.



(a)



(b)

FIGURA 1 Diagrama de Pareto dos efeitos da fonte de carbono, temperatura e concentração de NO<sub>3</sub> (S<sub>NO3</sub>) na concentração de PUFA para os ensaios autotróficos (a) e mixotróficos (b).

De acordo com a análise do planejamento experimental, para os cultivos mixotróficos (Figura 1b), nenhuma variável afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) a concentração de PUFA na biomassa da microalga *N. oculata*.

Para o cultivo autotrófico, as 3 variáveis apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração de PUFA, bem como a interação entre as variáveis fonte de carbono e temperatura, e fonte de carbono e concentração de  $\text{NO}_3$ . A fonte de carbono, tanto isolada como interagindo com as demais variáveis influenciou negativamente ( $p < 0,05$ ), reduzindo a concentração de PUFA, quando foi utilizado  $\text{CO}_2$ .

#### 4 CONCLUSÕES

Nos cultivos mixotróficos, a microalga *Nannochloropsis oculata* apresentou máxima concentração celular e produtividade ( $0,64 \text{ g.L}^{-1}$  e  $141,95 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente), quando cultivada em meio F/2 utilizando  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose como fonte orgânica de carbono,  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  e a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para os cultivos autotróficos a máxima concentração celular e produtividade ( $0,62 \text{ g.L}^{-1}$  e  $69,78 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente) foram obtidas quando a microalga foi cultivada  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  e  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os principais ácidos graxos encontrados, para ambos os cultivos, foram o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1 $\omega$ -9) e ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega$ -3), destacando-se o ácido palmítico (C16:0) que apresentou concentrações variando de 21,4 a 47% do total dos ácidos graxos analisados. O ácido eicosapentaenoico (C20:5) foi encontrado em concentrações de 23,59% nos cultivos autotróficos e até 25,15% nos cultivos mixotróficos, confirmando a potencial utilização desta microalga como fonte de ácidos graxos poliinsaturados, podendo estes serem produzidos utilizando um resíduo orgânico como fonte de nutrientes.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

#### 5 REFERÊNCIAS

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry Physiology, 37, 911-917.



CARVALHO, A.P.; MALCATA, F.X. (2000) Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*. *Cryptogamie Algal.*, 21, 59-71.

CHEN, F.; JOHNS, M.R. (1991) Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 3, 203-209.

CHINI ZITTELLI, G.; TREDICI, M.R.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VICENZINI, M. (1999) Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 70, 299–312.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48, 1146–1151.

COSTA, J.A.V.; RADMANN, E.M.; CERQUEIRA, V.S.; SANTOS, G.C.; CALHEIROS, M.N. (2006) Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição*, 17, 429-436.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P. (2003) *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 58, 76–80.

DAS, P.; AZIZ, S.S.; OBBARD, J.P. (2011) Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity, *Renewable Energy*, 36, 2524-2528.

FÁBREGAS, J.; MASEDA, A.; DOMÍNGUEZ, A.; OTERO, A. (2004) The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 31-35.

GUILLARD, R.R.L.; RYTHER, J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol*, 8, 229–239.

HARWOOD, J.L.; GUSCHINA, I.A. (1999) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91, 679-684.

HOSHIDA, H.; OHIRA, T.; MINEMATSU, A.; AKADA, R.; NISHIZAWA, Y. (2005) Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Applied Phycology*, 17, 29–34.

HU, H.; GAO, K. (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnology Letters*, 28, 987–992.

KOBERG, M.; COHEN, M.; BEN-AMOTZ, A.; GEDANKEN, A. (2011) Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation, *Bioresource Technology*, 102, 4265–4269.

LI, Z.S.; YUAN, H.L.; YANG, J.S.; LI, B.Z. (2011) Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, 102, 9128–9134.

LIN, Q.; GU, N.; LI, G.; LIN, J.; HUANG, L.; TAN, L.L. (2012) Effects of inorganic carbon concentration on carbon formation, nitrate utilization, biomass and oil accumulation of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Bioresource Technology*, 111, 353–359.

LOURENÇO, S.O.; BARBARINO, E.; MANCINI FILHO, J.; SCHINKE, K.P.; AIDAR, E. (2002) Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of ten marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41, 158–168.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. (2006) Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista Nutrição*, Campinas, 19, 761–770.

METCALFE, L.D.A.A.; SCHIMITZ, J.R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 38, 510.

PULZ, O.; GROSS, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635–648.

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

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. (2012) Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1495–1503.

ROSA, A.P.C.; CARVALHO, L.F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J.A.V. (2011) Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52, 3071-3073.

SFORZA, E.; CIPRIANI, R.; MOROSINOTTO, T.; BERTUCCO, A.; GIACOMETTI, G.M. (2012) Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 104, 523–529.

SIMOPOULOS, A.P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56, 365-379.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.

SU, C.H.; CHIEN, L.J.; GOMES, J.; LIN, Y.S.; YU, Y.K.; LIOU, J.S.; SYU, R.J. (2011) Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *Journal of Applied Phycology*, 23, 903–908.

VARFOLOMEEVA, S.D.; WASSERMAN, L.A. (2011) Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 789-807.

WAGENEN, J.V.; MILLER, T.W.; HOBBS, S.; HOOK, P.; CROWE, B.; HUESEMANN, M. (2012) Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5, 731-740

XU, F.; CAI, Z.; CONG, W.; OUYANG, F. (2004) Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 26, 1319–1322.

## PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* E *Chlorella kessleri* EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

Ana Priscila Centeno da Rosa<sup>1</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.  
Fax: +55(53)3233-8745. E-mail: jorge@pq.cnpq.br

### RESUMO

As microalgas com elevada concentração de ácidos graxos, como a *Chlorella*, tem recebido crescente interesse devido principalmente a capacidade de produção de biodiesel. Além disso, podem ser utilizadas na biofixação de CO<sub>2</sub>. O objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento e o perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* em cultivos autotróficos e mixotróficos utilizando metodologia de Planejamento Experimental Plackett Burman. A microalga *C. vulgaris* apresentou concentração celular máxima (0,97 g.L<sup>-1</sup>) no cultivo autotrófico, com fotoperíodo 24 h claro e 6% de CO<sub>2</sub>. A máxima produtividade (180,68 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi obtida no cultivo mixotrófico para *C. vulgaris* cultivada com 1 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e 5 g.L<sup>-1</sup> de resíduo industrial de oleaginosas (RIO). O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido graxo obtido em maiores concentrações, tanto para os cultivos autotróficos (21,22 a 53,78%) como para os mixotróficos (25,43 a 45,98%). A concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) variou de 12,19 a 41,17% nos cultivos autotróficos e de 10,98 a 34,26% nos cultivos mixotróficos, porém não foi afetada significativamente (p<0,05) pela microalga utilizada, podendo tanto a *C. vulgaris* como a *C. kessleri* serem utilizadas como fonte de ácidos graxos saturados e insaturados.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos, microalga, Plackett Burman, PUFA.

### ABSTRACT

Fatty acid rich microalgae, such as *Chlorella*, interest have been growing due to its biodiesel production capabilities while biofixating carbon dioxide. This work objective was to analyze growth profiles and fatty acid production by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella kessleri* in autotrophic and mixotrophic cultures through a Plackett Burman Experimental Design. The microalgae *C. vulgaris* presented maximum cellular concentration (0.97 g.L<sup>-1</sup>) in the autotrophic culture with 24 h photoperiod bright/dark and 6% of CO<sub>2</sub>. Maximum productivity (180.68 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) was obtained by *C. vulgaris* mixotrophic culture with 1 g.L<sup>-1</sup> of NaHCO<sub>3</sub> and 5 g.L<sup>-1</sup> of industrial waste oilseeds (RIO). The palmitic acid (C16:0) was the fatty acid with the highest concentration in the autotrophic culture (21.22 a 53.78%) as well as in the mixotrophic (25.43 a 45.98%). The polyunsaturated fatty acid concentration varied between 12.19 and 41.17% in the autotrophic cultures and between 10.98 and 34.26% in the mixotrophic cultures. However, its production was not statistically affected (p<0,05) by the utilized

microalgae. Therefore, both microalgae, *C. vulgaris* and *C. kessleri*, may be utilized as a saturated and unsaturated fatty acid source.

**Key-words:** Fatty acids, microalgae, Plackett Burman, PUFA.

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de ácidos graxos para aplicação em alimentos, fármacos, produção de biodiesel, entre outros, faz com que as microalgas sejam cada vez mais exploradas com relação a produção destes biocompostos, atualmente extraídos de fontes vegetais e óleo de pescado.

Os ácidos graxos presentes nas microalgas são na sua maioria, moléculas com 18 átomos de carbono saturados e insaturados, uma composição semelhante à de óleos vegetais (LIANG et al., 2009)

A *Chlorella* é uma microalga que vem sendo estudada como fonte de lipídios (PRIBYL et al., 2012; SHEN et al., 2010; WEI et al., 2009), proteínas (MAHBOOB et al., 2012), suplemento humano (GORS et al., 2010), para produção de biodiesel (LAM e LEE, 2012; LIU et al., 2010; XIONG et al., 2008), captação de gás carbônico (RADMANN et al., 2011; ROSA et al., 2011, MORAIS e COSTA, 2007), entre outras possibilidades.

A produção de biomassa microalgal requer uma grande quantidade de nutrientes para seu cultivo, sendo esta uma das etapas de maior custo de produção de biomassa. A fonte de carbono necessária para o crescimento celular é responsável por mais de 60% do custo com nutrientes (COSTA e MORAIS, 2010).

Por meio do processo fotossintético as microalgas utilizam a energia solar e convertam o CO<sub>2</sub> presente na atmosfera em biomassa e oxigênio. Porém esta conversão pode não ser suficiente para a produção de biomassa e de compostos de interesse, surgindo então a necessidade da utilização de outras fontes de carbono.

A utilização de resíduos orgânicos para o cultivo de microalgas surge como uma alternativa para redução dos custos de produção de biomassa microalgal, podendo ainda ser otimizada a utilização destes resíduos para a produção de alguns biocompostos de interesse (LIU et al., 2012; HOSOGLU et al., 2012; LAM e LEE, 2012; SHEN et al., 2010; WEI et al., 2009).

Estudos relatam que o conteúdo lipídico das microalgas pode ser modificado pelas condições de cultivo (LIANG et al., 2009), iluminância utilizada (KHOEYI et al., 2012) e alteração de nutrientes no meio de cultivo (PRAVEENKUMAR et al., 2012; YEH e CHANG, 2012; SHEN et al., 2010; CONVERTI et al., 2009).

Diante do contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento e o perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* em cultivos autotróficos e mixotróficos utilizando um Planejamento Experimental Plackett Burman.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismos e Meios de cultivo

Neste trabalho foram utilizadas as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri*, pertencentes a coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica (FURG). O meio utilizado para manutenção destas microalgas foi MBM (WATANABE, 1960), e para os experimentos foi também utilizado o meio F/2 (GUILLARD e RYTHER, 1962).

### 2.2 Condições de Cultivo

Foram realizados cultivos autotróficos e mixotróficos. Para cada forma de cultivo foi realizado um Planejamento Experimental Plackett Burman  $2^{7-4}$ , totalizando 16 experimentos, em duplicata.

Para os cultivos autotróficos foram estudadas as variáveis, microalga, fotoperíodo, concentração de gás carbônico injetado no cultivo ( $S_{CO_2}$ ), concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ ), concentração de ferro ( $S_{Fe}$ ), meio de cultivo e concentração celular inicial ( $X_0$ ). Já para os cultivos mixotróficos foram avaliadas as variáveis, microalga, fonte de carbono orgânico, concentração de carbono orgânico ( $S_{Co}$ ), concentração de nitrato ( $S_{NO_3}$ ), concentração da fonte de carbono inorgânico ( $S_{NaHCO_3}$ ), meio de cultivo e concentração celular inicial ( $X_0$ ). As Tabelas 1 e 2 apresentam as variáveis e níveis estudados para os cultivos autotróficos e mixotróficos, respectivamente.

Os ensaios tiveram a duração de 15 d e foram realizados em biorreatores tipo erlenmeyers de 2 L, com volume útil de 1,5 L, agitação contínua realizada por ar a 0,3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), equivalente a  $27 L_{ar}\cdot h^{-1}$  e mantidos em estufa termostatizada a 30°C.

Os meios F/2 e MBM foram preparados sem os nutrientes que foram variados. Para estes nutrientes, foram preparadas soluções concentradas e estas foram adicionadas diretamente nos erlenmeyers.

TABELA 1 Matriz do planejamento experimental Plackett Burman  $2^{7-4}$  para os cultivos autotróficos

Ensaio	Microalga	Fotoperíodo claro/escuro	S <sub>CO2</sub> (%)	S <sub>NO3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	S <sub>Fe</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Meio	X <sub>0</sub> (g.L <sup>-1</sup> )
A1	<i>C. vulgaris</i>	12h/12h	6	75	8	F/2	0,2
A2	<i>C. kessleri</i>	12h/12h	6	10	4	F/2	0,4
A3	<i>C. vulgaris</i>	24h/0h	6	10	8	MBM	0,4
A4	<i>C. kessleri</i>	24h/0h	6	75	4	MBM	0,2
A5	<i>C. vulgaris</i>	12h/12h	12	75	4	MBM	0,4
A6	<i>C. kessleri</i>	12h/12h	12	10	8	MBM	0,2
A7	<i>C. vulgaris</i>	24h/0h	12	10	4	F/2	0,2
A8	<i>C. kessleri</i>	24h/0h	12	75	8	F/2	0,4

S<sub>CO2</sub>: concentração de CO<sub>2</sub> adicionado aos cultivos; S<sub>NO3</sub>: concentração de nitrato no meio de cultivo; S<sub>Fe</sub>: concentração de ferro no meio de cultivo; X<sub>0</sub>: concentração celular inicial.

TABELA 2 Matriz do planejamento experimental Plackett Burman  $2^{7-4}$  para os cultivos mixotróficos

Ensaio	Microalga	Fonte de Carbono	S <sub>Co</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	S <sub>NO3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	S <sub>NaHCO3</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Meio	X <sub>0</sub> (g.L <sup>-1</sup> )
M1	<i>C. vulgaris</i>	Glicose	1	75	16,8	F/2	0,2
M2	<i>C. kessleri</i>	Glicose	1	10	1,0	F/2	0,4
M3	<i>C. vulgaris</i>	RIO	1	10	16,8	MBM	0,4
M4	<i>C. kessleri</i>	RIO	1	75	1,0	MBM	0,2
M5	<i>C. vulgaris</i>	Glicose	5	75	1,0	MBM	0,4
M6	<i>C. kessleri</i>	Glicose	5	10	16,8	MBM	0,2
M7	<i>C. vulgaris</i>	RIO	5	10	1,0	F/2	0,2
M8	<i>C. kessleri</i>	RIO	5	75	16,8	F/2	0,4

S<sub>Co</sub>: concentração da fonte de carbono orgânico no meio de cultivo; S<sub>NO3</sub>: concentração de nitrato no meio de cultivo; S<sub>NaHCO3</sub>: concentração de bicarbonato de sódio no meio de cultivo; X<sub>0</sub>: concentração celular inicial; RIO: Resíduo industrial de oleaginosas (28,4% sacarose, 18,6% estaquiose, 9,68% rafinose, 0,25% galactose, 0,24% glicose, 0,13% frutose).

Nos ensaios autotróficos o CO<sub>2</sub> foi misturado ao ar comprimido e a mistura adicionada aos cultivos por 15 min a cada 1 h, durante o período claro (ROSA et al., 2011). Para os ensaios mixotróficos foi utilizado o fotoperíodo de 12h claro/escuro e 3000 lux fornecidos por lâmpadas fluorescentes. A evaporação foi controlada pela manutenção do volume das culturas com reposição diária de água destilada.

### 2.3 Determinações Analíticas

A cada 24 h foram coletadas amostras para acompanhamento do pH e da concentração celular, calculada por meio da medida da densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro, com auxílio de curva de calibração relacionando densidade ótica com peso seco de biomassa. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro digital.

Ao final dos cultivos, as amostras foram centrifugadas e secas em estufa a 40 °C. Os lipídios foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por BLIGH e DYER (1959). A esterificação dos lipídios, para obtenção dos ésteres dos ácidos graxos, foi realizada de acordo com o método proposto por METCALFE e SCHIMITZ (1966).

A determinação de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso modelo Varian 3400CX, equipado com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida contendo fase estacionária de polietileno glicol, com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro. O gás de arraste foi nitrogênio a 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100 °C e, a seguir, houve aumento de 8 °C.min<sup>-1</sup> até 230 °C, permanecendo por 20 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção das amostras com padrões (Sigma, EUA) e quantificados por normalização das áreas dos picos.

### 2.4 Avaliação do Crescimento

Para avaliação do crescimento foi determinada, para cada experimento, a produtividade celular máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ , mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) segundo a equação  $P = (X_t - X_{t-1}).t^{-1}$ , onde  $X_t$  é a concentração celular (mg.L<sup>-1</sup>) no tempo t (d).



## 2.5 Análise Estatística

A concentração celular máxima, produtividade máxima e concentração de ácidos graxos, foram avaliadas segundo estimativa dos efeitos das variáveis. Os resultados apresentados são os valores médios das duplicatas com nível de 95% de confiança.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta as concentrações celulares máximas ( $X_{máx}$ ) e produtividades máximas ( $P_{máx}$ ) para os cultivos autotróficos e mixotróficos. As máximas concentração celular e produtividade no cultivo autotrófico (0,97 g.L<sup>-1</sup> e 157,76 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente) foram observadas no ensaio A3 em que a microalga *C. vulgaris* foi cultivada com 6% de CO<sub>2</sub> e fotoperíodo de 24 h claro.

Para o cultivo mixotrófico a máxima concentração celular (0,80 g.L<sup>-1</sup>) foi observada no ensaio M5 em que a microalga *C. vulgaris* foi cultivada com 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 1 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>. Para este ensaio foi observada elevada produtividade (176,83 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), porém esta é um pouco abaixo da máxima observada (180,68 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) no ensaio M7, quando *C. vulgaris* foi cultivada com 5 g.L<sup>-1</sup> de RIO (resíduo industrial de oleaginosas).

TABELA 3 - Concentração celular máxima ( $X_{máx}$ , g.L<sup>-1</sup>) e produtividade máxima ( $P_{máx}$ , mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) para os cultivos autotróficos e mixotróficos das microalgas *C. vulgaris* e *C. kessleri*.

Ensaio	Cultivo Autotrófico		Cultivo Mixotrófico	
	$X_{máx}$	$P_{máx}$	$X_{máx}$	$P_{máx}$
1	0,51	256,35	0,19	22,04
2	0,87	105,96	0,70	122,27
3	0,97	157,76	0,42	74,89
4	0,90	112,40	0,45	80,25
5	0,70	135,30	0,80	176,83
6	0,36	32,81	0,29	99,45
7	0,82	124,23	0,63	180,68
8	0,81	94,76	0,53	38,07

Cultivos autotróficos: A1 à A8; Cultivos mixotróficos: M1 à M8

Comparando os cultivos autotróficos e mixotróficos, observa-se maiores valores de concentração celular e produtividade nos cultivos autotróficos. Maiores concentrações celulares em cultivos autotróficos também foram observados por LAM e LIM (2012) no cultivo de *C. vulgaris*. Os autores observaram concentração celular máxima 0,78 g.L<sup>-1</sup> no cultivo autotrófico e 0,5 g.L<sup>-1</sup> no cultivo mixotrófico, utilizando fertilizante orgânico como fonte de carbono.

PRIBYL et al. (2012) estudaram o crescimento de 3 cepas de *Parachlorella kessleri* e 4 cepas de *C. vulgaris* em cultivo autotrófico, e observaram produtividade variando de 0,94 a 1,29 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para a primeira espécie, e 0,72 a 1,05 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para *C. vulgaris*, porém estes ensaios foram realizados *outdoor* e em fotobiorreator do tipo *thin layer*, que permite maior aproveitamento da luz solar, promovendo assim maior crescimento celular.

*C. kessleri* quando cultivada por ROSA et al. (2011) em fotobiorreator do tipo *raceway* com controle de temperatura e iluminância e adição de 12%v/v de CO<sub>2</sub>, alcançou concentração celular máxima 0,54 g.L<sup>-1</sup>. Essa concentração foi elevada para 2,62 g.L<sup>-1</sup> quando a microalga foi cultivada *outdoor*.

As produtividades dos cultivos mixotróficos do presente trabalho estão de acordo com as encontradas por LI et al. (2011) no cultivo de *C. minutissima* UTEX2341 (110 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), porém utilizando 1 g.L<sup>-1</sup> de glicerina como fonte de carbono.

A análise do planejamento experimental, para os cultivos autotróficos (Tabela 4), mostrou que a concentração celular máxima e a produtividade máxima foram influenciadas significativa e negativamente (p<0,05) pela concentração de CO<sub>2</sub> utilizada. As variáveis fotoperíodo e concentração de ferro também influenciaram significativamente (p<0,05) na concentração celular máxima atingida.

LIU et al. (2008) cultivaram *C. vulgaris* em meio F/2 suplementado com 0,67 mg.L<sup>-1</sup> de Fe e não observaram aumento na concentração celular, porém a biomassa obtida apresentou concentração de lipídios de 56,6%. A variável fotoperíodo foi avaliada por LAM e LEE (2012) em cultivos mixotróficos de *C. vulgaris* e observaram que a microalga quando cultivada com fotoperíodo de 24 h claro alcançou concentração celular de 0,31 g.L<sup>-1</sup> e quando cultivada com 12 h claro/escuro, a concentração celular obtida foi 0,2 g.L<sup>-1</sup>.

TABELA 4 Estimativa dos efeitos das variáveis microalga, fotoperíodo, concentração de CO<sub>2</sub> (S<sub>CO2</sub>, %), concentração de nitrato (S<sub>NO3</sub>, mg.L<sup>-1</sup>), concentração de ferro (S<sub>Fe</sub>, mg.L<sup>-1</sup>), meio de cultivo e concentração celular inicial (X<sub>0</sub>, g.L<sup>-1</sup>) na concentração celular máxima (X<sub>máx</sub>, g.L<sup>-1</sup>) e produtividade máxima (P<sub>máx</sub>, mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) dos cultivos autotróficos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p
<b>X<sub>máx</sub></b>				
Média	0,74	0,02	29,63	0,00
Microalga	-0,02	0,05	-0,31	0,76
Fotoperíodo	0,27	0,05	5,34	0,00
S <sub>CO2</sub>	-0,14	0,05	-2,77	0,02
S <sub>NO3</sub>	-0,03	0,05	-0,56	0,59
S <sub>Fe</sub>	-0,16	0,05	-3,13	0,01
Meio de cultivo	0,02	0,05	0,42	0,69
X <sub>0</sub>	0,19	0,05	3,79	0,00
<b>P<sub>máx</sub></b>				
Média	127,45	10,44	12,21	0,00
Microalga	-81,93	20,88	-3,92	0,00
Fotoperíodo	-10,32	20,88	-0,49	0,63
S <sub>CO2</sub>	-61,34	20,88	-2,94	0,02
S <sub>NO3</sub>	44,51	20,88	2,13	0,06
S <sub>Fe</sub>	15,95	20,88	0,76	0,47
Meio de cultivo	35,76	20,88	1,71	0,12
X <sub>0</sub>	-8,00	20,88	-0,38	0,71

t: valor do teste t de Student; p: significância estatística.

Para os cultivos mixotróficos (Tabela 5), a concentração de NaHCO<sub>3</sub> influenciou significativamente (p<0,05) a concentração celular máxima e a produtividade máxima, reduzindo estas duas respostas quando foi utilizado 16,8 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>. A concentração da fonte de carbono orgânica também influenciou significativamente (p<0,05) as respostas, aumentando X<sub>máx</sub> e P<sub>máx</sub>, quando utilizado 5 g.L<sup>-1</sup> da fonte de carbono.

Cultivo mixotrófico também foi testado por SFORZA et al. (2012) para o crescimento da microalga *Nannochloropsis salina*. Os autores utilizaram glicerol (1% p/v) como fonte orgânica de carbono e obtiveram concentração celular máxima de 0,43 g.L<sup>-1</sup> em um cultivo de 16 d.

TABELA 5 Estimativa dos efeitos das variáveis microalga, fonte de carbono orgânico, concentração de carbono orgânico (S<sub>Co</sub>, g.L<sup>-1</sup>), concentração de nitrato (S<sub>NO3</sub>, mg.L<sup>-1</sup>), concentração de bicarbonato de sódio (S<sub>NaHCO3</sub>, g.L<sup>-1</sup>), meio de cultivo e concentração celular inicial (X<sub>0</sub>, g.L<sup>-1</sup>) na concentração celular máxima (X<sub>máx</sub>, g.L<sup>-1</sup>) e produtividade máxima (P<sub>máx</sub>, mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) dos cultivos mixotróficos.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	P
<b>X<sub>máx</sub></b>				
Média	0,50	0,01	38,80	0,00
Microalga	-0,02	0,03	-0,61	0,56
Fonte de carbono orgânico	0,01	0,03	0,47	0,65
S <sub>Co</sub>	0,12	0,03	4,69	0,00
S <sub>NO3</sub>	-0,02	0,03	-0,63	0,54
S <sub>NaHCO3</sub>	-0,29	0,03	-11,12	0,00
Meio de cultivo	0,02	0,03	0,85	0,42
X <sub>0</sub>	0,22	0,03	8,48	0,00
<b>P<sub>máx</sub></b>				
Média	99,31	7,69	12,92	0,00
Microalga	-28,60	15,37	-1,86	0,10
Fonte de carbono orgânico	-11,67	15,37	-0,76	0,47
S <sub>Co</sub>	48,89	15,37	3,18	0,01
S <sub>NO3</sub>	-40,03	15,37	-2,60	0,03
S <sub>NaHCO3</sub>	-81,39	15,37	-5,29	0,00
Meio de cultivo	-17,09	15,37	-1,11	0,30
X <sub>0</sub>	7,41	15,37	0,48	0,64

t: valor do teste t de Student; p: significância estatística.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os principais ácidos graxos encontrados, somatório de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e o somatório das famílias ω-3 e ω-6, nos cultivos autotróficos e mixotróficos, respectivamente.

Tanto para os cultivos autotróficos como para os mixotróficos destacam-se os ácidos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2), sendo o último um ácido graxo essencial pertencente a família  $\omega$ -6. Os ácidos graxos essenciais não são sintetizados pelo organismo humano, devendo ser ingeridos por meio da dieta e são utilizados, principalmente, na prevenção de doenças cardiovasculares (ARANCETA e RODRIGO, 2012).

TABELA 6 - Concentração (%) dos principais ácidos graxos, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e  $\omega$ 3+ $\omega$ 6 presentes na biomassa da microalga *C. vulgaris* e *C. kessleri* nos cultivos autotróficos.

Ensaio	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1 $\omega$ 9ct	C18:2 $\omega$ 6t	C18:3 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 3	PUFA	( $\omega$ 3+ $\omega$ 6)
A1	35,58	6,73	0,71	2,13	16,29	21,09	4,85	6,73	34,35	33,84
A2	31,33	1,00	3,81	1,96	15,61	31,60	0,08	8,40	41,17	41,17
A3	30,38	6,44	1,42	1,80	19,27	21,79	2,27	10,37	36,95	36,78
A4	41,02	1,80	1,24	2,37	12,65	24,95	0,92	2,75	33,16	33,16
A5	21,22	17,49	1,10	1,71	12,26	21,77	4,10	13,31	39,44	39,27
A6	45,97	0,54	1,89	4,77	18,46	18,04	0,47	3,34	22,39	22,17
A7	53,78	1,50	0,40	3,33	21,90	6,99	1,38	2,15	12,19	11,27
A8	47,91	1,10	1,30	2,58	12,35	16,67	0,30	1,98	24,99	24,99

C16:0 – Ácido palmítico; C16:1 – Ácido palmitoleico; C17:1 – Ácido margaroleico; C18:0 – Ácido esteárico; C18:1 – Ácido oleico; C18:2 – Ácido linoleico; C18:3 $\omega$ 3 – Ácido  $\alpha$ -linolênico; C18:3 $\omega$ 6 – Ácido  $\gamma$ -linolênico. c: cis; t: trans.

As concentrações de C16:0 e C16:1, tanto para o cultivo autotrófico como para o mixotrófico, estão acima dos valores encontrados por PRIBYL et al. (2012) para a *C. vulgaris* CCALA-256 (20,51 e 0,52%, respectivamente), quando esta foi cultivada autotróficamente, em sistema *outdoor* e em fotobiorreator do tipo *thin layer*. Também são superiores aos encontrados por LIM e LAM (2012) (25 e 2%, respectivamente) na biomassa de *C. vulgaris*, em cultivo mixotrófico, utilizando fertilizante orgânico como fonte de nutrientes. LI et al. (2011) quando utilizaram *Chlorella minutissima* UTEX2341 cultivada com glicerina como fonte orgânica de carbono, a 25 °C obtiveram 14,91% de ácido palmítico (C16:0) e 0,98% de ácido palmitoleico (C16:1).

TABELA 7 - Concentração (%) dos principais ácidos graxos, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e  $\omega 3+\omega 6$  presentes na biomassa da microalga *C. vulgaris* e *C. kessleri* nos cultivos mixotróficos.

Ensaio	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1 $\omega 9ct$	C18:2 $\omega 6t$	C18:3 $\omega 6$	C18:3 $\omega 3$	PUFA	( $\omega 3+\omega 6$ )
M1	29,58	3,84	1,46	3,23	25,62	7,13	4,40	18,60	30,92	30,92
M2	44,80	1,12	1,97	3,60	16,43	21,68	0,36	3,68	25,90	25,90
M3	25,43	7,64	0,89	3,10	25,18	9,84	5,48	17,90	33,61	33,47
M4	45,98	1,46	2,15	3,92	16,89	15,66	0,59	3,62	22,34	22,34
M5	36,26	4,00	1,38	3,37	23,36	15,39	2,68	6,66	24,92	24,92
M6	36,20	2,45	2,71	4,08	17,10	20,51	0,96	2,28	28,64	28,21
M7	33,26	3,36	0,94	2,45	25,88	16,36	4,89	0,70	10,98	10,98
M8	31,51	3,23	1,82	5,35	15,37	21,67	2,72	2,48	34,26	34,26

C16:0 – Ácido palmítico; C16:1 – Ácido palmitoleico; C17:1 – Ácido margaroleico; C18:0 – Ácido esteárico; C18:1 – Ácido oleico; C18:2 – Ácido linoleico; C18:3 $\omega 3$  – Ácido  $\alpha$ -linolênico; C18:3 $\omega 6$  – Ácido  $\gamma$ -linolênico. c: cis; t: trans.

COSTA et al. (2006) cultivaram *C. vulgaris* e *C. minutissima* autotróficamente e obtiveram até 26,51% de C16:0, quando estas foram cultivadas entre 30 e 35°C e 1%v/v de CO<sub>2</sub> e 16,8 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> como fontes de carbono. Os autores obtiveram concentração de PUFA variando de 18,01 a 35,60% para *C. vulgaris* e 2,41 a 13,01% para *C. minutissima*. RADMANN e COSTA (2008) analisaram o perfil de ácidos graxos das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *C. vulgaris* LEB-106, cultivadas com CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO e obtiveram concentrações de ácido linoleico (C18:2) de 2,71, 3,98, 3,53 e 6,26%, respectivamente. Estes valores foram inferiores aos encontrados no presente trabalho, em que a concentração de C18:2 variou de 6,99 a 31,60% nos cultivos autotróficos, e de 7,13 a 21,68% nos cultivos mixotróficos. No trabalho realizado por estes autores não foi detectado a presença do ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3 $\omega 3$ ) na biomassa da *C. vulgaris*.

As Figuras 1 e 2 mostram os diagramas de Pareto dos efeitos das variáveis na concentração de PUFA para os dois planejamentos experimentais realizados.

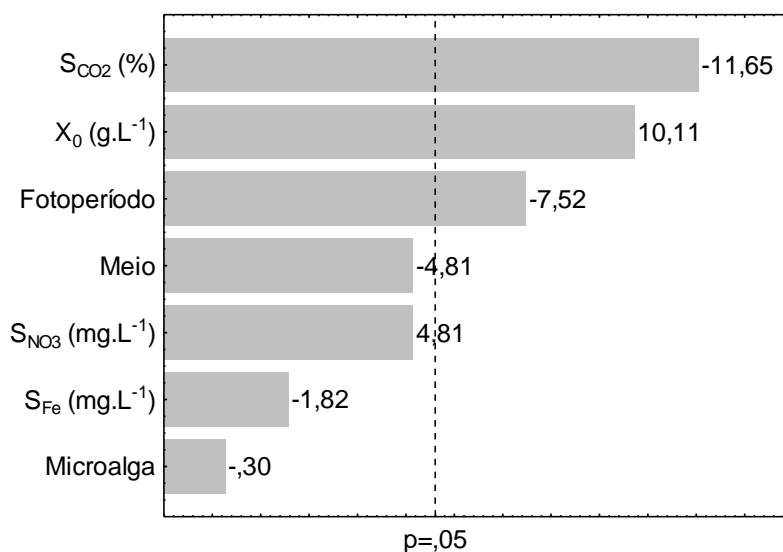


FIGURA 1 Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração de  $CO_2$  ( $S_{CO_2}$ ), concentração celular inicial ( $X_0$ ), fotoperíodo, meio de cultivo, concentração de nitrato no meio ( $S_{NO_3}$ ), concentração de ferro no meio ( $S_{Fe}$ ) e microalga, na concentração de PUFA dos cultivos autotróficos.

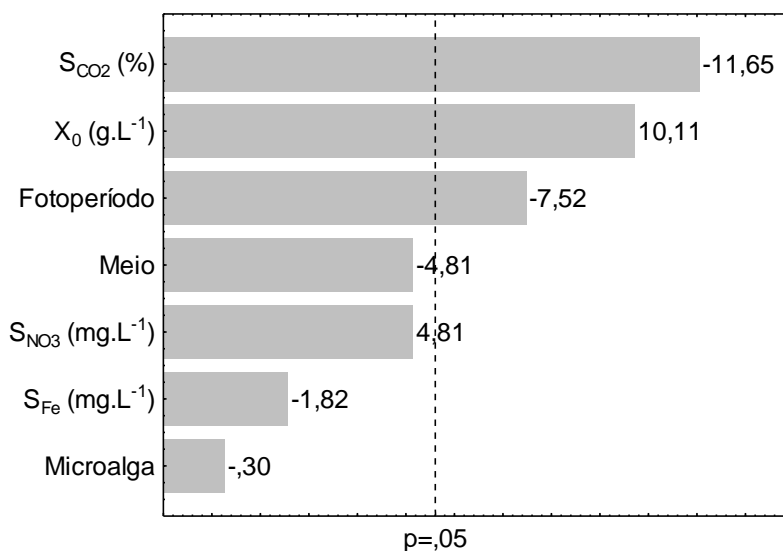


FIGURA 2 Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração de bicarbonato de sódio no meio ( $S_{NaHCO_3}$ ), concentração celular inicial ( $X_0$ ), meio de cultivo, concentração de carbono orgânico no meio ( $S_{Co}$ ), concentração de nitrato no meio ( $S_{NO_3}$ ), fonte de carbono orgânico e microalga, na concentração de PUFA dos cultivos mixotróficos.

A concentração de PUFA no presente trabalho variou de 12,19 a 41,17% nos cultivos autotróficos e de 10,98 a 34,26% nos cultivos mixotróficos. Este resultado foi influenciando significativamente ( $p < 0,05$ ), tanto no cultivo autotrófico como no mixotrófico, pela concentração da fonte de carbono utilizada (Figuras 1 e 2).

No cultivo autotrófico, a utilização de 12%v/v de  $\text{CO}_2$  e fotoperíodo de 24 h claro, provocaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) de 11,65 e 7,52% na concentração de PUFA, respectivamente. No cultivo mixotrófico, a utilização de 16,8  $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  no meio de cultivo, incrementou a concentração de PUFA em 8,08%.

#### 4 CONCLUSÃO

A microalga *Chlorella vulgaris* apresentou concentração celular máxima (0,97  $\text{g.L}^{-1}$ ) no cultivo autotrófico, com fotoperíodo de 24 h claro e 6% de  $\text{CO}_2$ . A máxima produtividade (180,68  $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) foi obtida no cultivo mixotrófico quando cultivada com 1  $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  e 5  $\text{g.L}^{-1}$  de resíduo industrial de oleaginosas (RIO).

O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido graxo obtido em maiores concentrações tanto para os cultivos autotróficos (21,22 a 53,78%) como para os mixotróficos (25,43 a 45,98%). Destacou-se também, para ambos os cultivos, a produção o ácido oleico (C18:1), com concentrações variando de 12,26 a 21,90% para os cultivos autotróficos e de 15,37 a 25,88% para os cultivos mixotróficos. A concentração de PUFA variou de 12,19 a 41,17% nos cultivos autotróficos e de 10,98 a 34,26% nos cultivos mixotróficos. A produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) não foi afetada significativamente ( $p < 0,05$ ) pela microalga utilizada, podendo tanto a *Chlorella vulgaris* como a *Chlorella kessleri* serem utilizadas como fonte de ácidos graxos saturados e insaturados, utilizando tanto  $\text{CO}_2$  como resíduo industrial de oleaginosas para sua produção.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.



## 5 REFERÊNCIAS

- ARANCETA, J.; RODRIGO, C.P. (2012) Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, 107, S8–S22.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37, 911-917.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48, 1146–1151.
- COSTA, J.A.V. MORAIS, M.G. (2010) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102, 2–9.
- COSTA, J.A.V.; RADMANN, E.M.; CERQUEIRA, V.S.; SANTOS, G.C.; CALHEIROS, M.N. (2006) Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição*, 17, 429-436.
- GÖRS, M.; SCHUMANN, R.; HEPPELE, D.; KARSTEN, U. (2010) Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. *Journal Applied Phycology*, 22, 265–276.
- GUILLARD, R.R.L.; RYTHER, J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol*, 8, 229–239.
- HOSOGLU, M.I.; GULTEPE, I.G.; ELIBOL, M. (2012) Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, 61, 11– 19.
- KHOEYI, Z.A.; SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z. (2012) Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20, 41–49.
- LAM, M.K.; LEE, K.T. (2012) Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied Energy*, 94, 303-308.

LI, Z.S.; YUAN, H.L.; YANG, J.S.; LI, B.Z. (2011) Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, 102, 9128–9134.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31, 1043-1049.

LIU, J.; HUANG, J.; YUE, J.; CHEN, F. (2012) Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 107, 393–398

LIU, J.; HUANG, J.; FAN, K.W.; JIANG, Y.; ZHONG, Y.; SUN, Z.; CHEN, F. (2010) Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresource Technology*, 101, 8658-8663.

LIU, Z.Y.; WANG, G.C.; ZHOU, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99, 4717–4722.

MAHBOOB, S.; RAUF, A.; ASHRAF, M.; SULTANA, T.; SULTANA, S.; JABEEN, F.; RAJOKA, M.I.; AL-BALAWI, H.F.A.; AL-GHANIM, K.A. (2012) High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture International*, 20, 455–466.

METCALFE, L.D.A.A.; SCHIMITZ, J.R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 38, 510.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. (2007) Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters*, 29, 1349-1352.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; AKBARSHA, M.A.; THAJUDDIN, N. (2012) Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 37, 60-66.

PRIBYL, P.; CEPÁK, V.; ZACHLEDER, V. (2012) Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 549–561.

RADMANN, E.M.; CAMERINI, F.V.; SANTOS, T.D.; COSTA, J.A.V. (2011) Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management*, 52, 3132–3136.

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

ROSA, A.P.C.; CARVALHO, L.F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J.A.V. (2011) Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52, 3071-3073.

SFORZA, E.; CIPRIANI, R.; MOROSINOTTO, T.; BERTUCCO, A.; GIACOMETTI, G.M. (2012) Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 104, 523–529.

SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. (2010) Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1674–1684.

WATANABE, A. (1960) List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. *Journal of General and Applied Microbiology*, 6, 1-4.

WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S.T. (2009) Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 1383–1389.

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. (2008) High-density fermentation of microalgae *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 29-36.

YEH, K.L.; CHANG, J.S. (2012) Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalgae *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120–127.

## **CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL**

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A produtividade da microalga *Tetraselmis suecica* F&M-M33 cultivada em sistema *outdoor* e regime semicontínuo foi influenciada pela concentração celular mantida nos cultivos, disposição dos fotobiorreatores e pela radiação solar incidida. Quando os ensaios foram realizados em fotobiorreatores inclinados, a produtividade média foi  $0,75 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , quando foi mantida concentração celular de  $70 \text{ g.m}^{-2}$ . Quando os ensaios foram realizados em GWP verticais, simulando uma planta de produção de biomassa microalgal, foi observado produtividade média  $0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . A produção comercial de biomassa microalgal em fotobiorreatores do tipo *Green Wall Panel* (GWP) é realizada de maneira que não haja interferência de sombreamento nas culturas, porém o presente trabalho mostrou que podem ser reduzidos os custos de produção da microalga *T. suecica* F&M-M33, por meio da disposição dos fotobiorreatores, mantendo elevadas produtividades, porém com um número maior de fotobiorreatores por área. As máximas concentrações proteicas (49,87 a 51,01%) e lipídicas (22,03 a 23,36%) foram obtidas quando a microalga foi cultivada nos fotobiorreatores verticais e dispostos paralelamente sem interferência de sombreamento nas laterais.

A microalga *Nannochloropsis oculata* quando cultivada em condições mixotróficas apresentou máxima concentração celular e produtividade ( $0,64 \text{ g.L}^{-1}$  e  $141,950 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente), quando cultivada em meio F/2 utilizando  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose como fonte orgânica de carbono,  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  e a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para os cultivos autotróficos a máxima concentração celular e produtividade ( $0,62 \text{ g.L}^{-1}$  e  $69,778 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente) foram obtidas quando a microalga foi cultivada  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  e  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os principais ácidos graxos encontrados, para ambos os cultivos, foram o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1 $\omega$ -9) e ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega$ -3), destacando-se o ácido palmítico (C16:0) que apresentou concentrações variando de 21,4 a 47% do total dos ácidos graxos analisados. O ácido eicosapentaenoico (C20:5) foi encontrado em concentrações de até 24% nos cultivos autotróficos e 25% nos cultivos mixotróficos, confirmando a potencial utilização desta microalga como fonte de ácidos graxos poliinsaturados, podendo estes serem produzidos utilizando um resíduo orgânico como fonte de nutrientes.

A microalga *Chlorella vulgaris* apresentou concentração celular máxima ( $0,97 \text{ g.L}^{-1}$ ) no cultivo autotrófico, com fotoperíodo de 24 h claro e 6% de  $\text{CO}_2$ . A máxima

produtividade ( $180,68 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) foi obtida no cultivo mixotrófico quando cultivada com  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de RIO (resíduo industrial de oleaginosas). O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido graxo obtido em maiores concentrações tanto para os cultivos autotróficos (21,22 a 53,78%) como para os mixotróficos (25,43 a 45,98%). Destacou-se também, para ambos os cultivos, a produção o ácido oleico (C18:1), com concentrações variando de 12,26 a 21,90% para os cultivos autotróficos e de 15,37 a 25,88% para os cultivos mixotróficos. A concentração de PUFA variou de 12,19 a 41,17% nos cultivos autotróficos e de 10,98 a 34,26% nos cultivos mixotróficos. A produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) não foi afetada significativamente ( $p < 0,05$ ) pela microalga utilizada, podendo tanto a *Chlorella vulgaris* como a *Chlorella kessleri* serem utilizadas como fonte de ácidos graxos saturados e insaturados, utilizando tanto  $\text{CO}_2$  como resíduo industrial de oleaginosas para sua produção.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a produção da microalga *Tetraselmis suecica* em fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel* inclinado simulando uma planta de produção de biomassa.
- ✓ Avaliar a produção da microalga *Tetraselmis suecica* em fotobiorreator tubular horizontal.
- ✓ Avaliar a produção de ácidos graxos pela microalga *Tetraselmis suecica*.
- ✓ Utilizar outros resíduos orgânicos para produção de ácidos graxos das microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri*.
- ✓ Cultivar as microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* em fotobiorreator *Green Wall Panel*.
- ✓ Avaliar cultivos *outdoor* das microalgas *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* na região sul do Brasil.

## **APÊNDICES**



**APÊNDICE 1 CULTIVO DE *Tetraselmis suecica* F&M-M33 EM FOTOBIORREATORES *GREEN WALL PANEL***



FIGURA 1 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* dispostos paralelamente

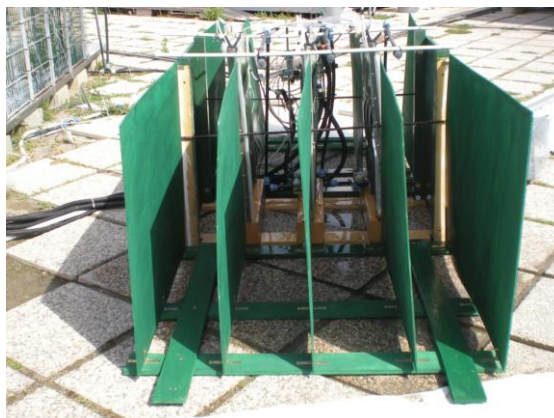
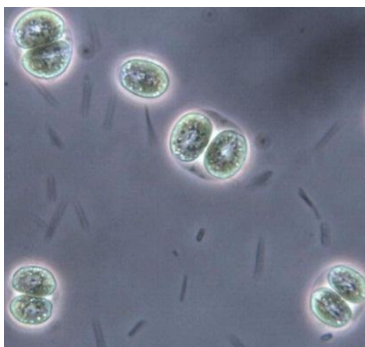
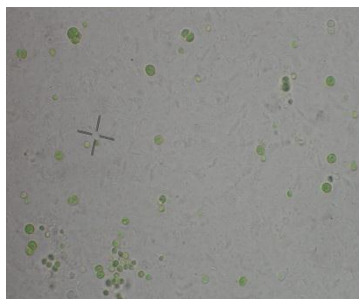
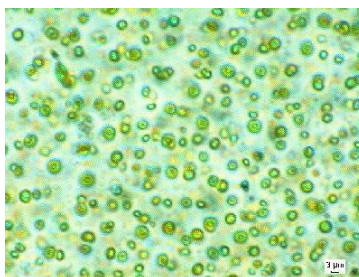


FIGURA 2 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* dispostos paralelamente simulando uma planta de produção de microalgas



FIGURA 3 Fotobiorreatores *Green Wall Panel* vertical, inclinado para o sul e inclinado para o norte

**APÊNDICE 2 CULTIVOS DE *Nannochloropsis oculata*****APÊNDICE 3 CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris* E *Chlorella kessleri***

**APÊNDICE 4 FOTOS DAS CÉLULAS DAS MICROALGAS**FIGURA 1 Células de *Tetraselmis suecica*FIGURA 2 Células de *Nannochloropsis oculata*FIGURA 3 Células de *Chlorella vulgaris*FIGURA 4 Células de *Chlorella kessleri*

# ANEXOS

**ANEXO A - MEIOS DE CULTIVO**

TABELA 1 Composição do Meio de Cultivo Bristol Modificado (MBM).

Reagentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	0,25
CaCl <sub>2</sub>	0,01
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
NaCl	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
Solução A <sub>5</sub>	1 mL

**Solução A<sub>5</sub>:** (g.L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 2,86; MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O: 1,81; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O: 0,222; CuCO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O:0,079; MnO<sub>3</sub>: 0,015.

TABELA 2 Composição do Meio de Cultivo F/2

Reagentes	Volume (mL)
NaNO <sub>3</sub> (75,0 g.L <sup>-1</sup> )	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (5,0 g.L <sup>-1</sup> )	1
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O (30,0 g.L <sup>-1</sup> )	1
Solução de metais	1
Solução de vitaminas	0,5
Água do mar	1000

TABELA 3 Solução de metais para o Meio F/2

Reagentes	Concentração
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,15g
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	4,36g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (9.8 g.L <sup>-1</sup> )	1 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (6.3 g.L <sup>-1</sup> )	1 mL
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (22.0 g.L <sup>-1</sup> )	1 mL
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (10.0 g.L <sup>-1</sup> )	1 mL
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (180.0 g.L <sup>-1</sup> )	1 mL
Água destilada	1 L

TABELA 4 Solução de vitaminas para o Meio F/2

Reagentes	Concentração
Vitamina B <sub>12</sub> (1,0 g.L <sup>-1</sup> )	1 mL
Biotina (0,1 g.L <sup>-1</sup> )	10 mL
Tiamina HCl	200 mg
Água destilada	1 L