UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RAQUEL REZENDE DOS SANTOS

ESTUDO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* VISANDO O AUMENTO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E LIPÍDIOS

RIO DE JANEIRO
2013

Raquel Rezende dos Santos

Estudo de Diferentes Condições de Cultivo de *Chlorella vulgaris* Visando o Aumento da Produtividade em Biomassa e Lipídios

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Donato Alexandre Gomes Aranda

Co-orientadora: Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Rio de Janeiro
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Raquel Rezende.
Estudo de Diferentes Condições de Cultivo de *Chlorella vulgaris* Visando o Aumento da Produtividade em biomassa e Lipídios / Raquel Rezende dos Santos. - 2013.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Donato Alexandre Gomes Aranda.
Co-orientadora: Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira.

1. Microalga 2.Obtenção de biomassa 3.Conteúdo lipídico 4.Biodiesel 5.Planejamento experimental.

I. Aranda, Donato Alexandre Gomes (Orientador). II. Teixeira, Cláudia Maria Luz Lapa (Co-orientadora). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de química. IV. Estudo de Diferentes Condições de Cultivo de *Chlorella vulgaris* Visando o Aumento da Produtividade em Biomassa e Lipídios.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Rezende dos Santos

ESTUDO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* VISANDO O AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada por

(Donato Alexandre Gomes Aranda, Professor associado, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira, Tecnologista, Instituto Nacional de Tecnologia)

(Juliana Espada Lichston, Professor adjunto, Universidade Federal do Rio Grande do Norte)

(Anita Ferreira da Silva, Professor adjunto, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Suely Pereira Freitas, Professor adjunto, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

“Mesmo não florescendo a figueira e não havendo uvas nas videiras, mesmo falhando a safra de azeitonas, não havendo produção de alimentos nas lavouras, nem ovelhas no curral nem bois nos estábulos, ainda assim eu exultarei no Senhor e me alegrarei no Deus da minha salvação. O Senhor, o soberano, é a minha força; ele faz os meus pés como os de cervo; faz-me andar em lugares altos.”

Habacuque 3:17-19

A Ele toda honra, glória, louvor e adoração! Meu Deus, obrigada pela sua grande provisão do início ao fim deste trabalho. Obrigada por permitir a realização de mais esse sonho. Tu és fiel Senhor!

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Leonardo Santos, pelo amor, carinho e cuidado dispensados a mim. Obrigada por me compreender e apoiar em todos os momentos dessa jornada e principalmente por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Você é um presente de Deus. Eu te amo!

Aos meus pais, Denise e Salvador Rezende, pelo amor incondicional**,** pelo exemplo de vida, pela confiança e incentivo de todos esses anos. Ao longo do mestrado, também pude realizar sonhos pessoais. E isso eu devo a vocês, que me ajudaram e me permitiram vivenciar concomitantemente esses momentos especiais. Jamais conseguirei agradecer-lhes da maneira que merecem. Amo vocês!

Ao meu irmão, Daniel Rezende, por toda amizade e cumplicidade. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. A sua alegria foi a minha força e o seu abraço o meu socorro. Eu te amo!

À minha avó, meus sogros, cunhados, tios e primos. Obrigada por sempre torcerem pelo meu sucesso. A ajuda de vocês ficou evidente através de inúmeras atitudes.

À Dr. Cláudia Teixeira, pela orientação e dedicação. Agradeço pelas longas conversas científicas ou não. Agradeço pelos conselhos e principalmente pelas críticas, que me permitiram amadurecer enquanto pessoa e profissional.

À equipe do laboratório de Biotecnologia de Microalgas, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração. Em especial aos alunos de iniciação científica, Daniel e Raíssa, pelo apoio frente a diversos experimentos no laboratório, bem como inúmeras dúvidas e indagações científicas compartilhadas.

Ao professor Donato Aranda e equipe do laboratório de Tecnologia Verde, por serem solícitos aos meus pedidos em diversas etapas deste trabalho.

Ao Laboratório de Análise Orgânica Instrumental, Instituto Nacional de Tecnologia, pela análise do perfil de ácidos graxos.

Ao Laboratório de Materiais Poliméricos, Instituto Nacional de Tecnologia, pela disponibilidade de equipamentos laboratoriais.

Ao Instituto Nacional de Tecnologia, por me permitir usufruir do Laboratório de Biotecnologia de Microalgas para realizar este trabalho.

À coordenação, professores e funcionários do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pela colaboração e orientação nos momentos que mais precisei.

Ao apoio financeiro da CAPES, UFRJ, PIBITI, INT e FUNAPE sem o qual este trabalho não seria possível.

RESUMO

Raquel Rezende dos Santos

ESTUDO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* VISANDO O AUMENTO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E LIPÍDIOS

Orientador: Donato Alexandre Gomes Aranda
Co-orientadora: Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

O uso de lipídios obtidos a partir da biomassa de microalgas tem sido descrito como uma alternativa promissora para a indústria petro-diesel e envolve etapas como o cultivo de microalgas, separação da biomassa, extração e transesterificação de lipídios. O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes condições de cultivo de *Chlorella vulgaris* visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios. Para cumprir seu objetivo principal, o trabalho foi dividido em três etapas: comparação de diferentes metodologias de extração de lipídios totais; avaliação de diferentes condições de cultivo visando maximizar a produtividade em biomassa; e aplicação de condição de estresse visando aumentar a produtividade em lipídios. Para extração dos lipídios totais foram testados os solventes etanol, hexano e uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção 2:1 e 1:2. Para as misturas de clorofórmio e metanol foram comparadas ainda variações na metodologia quanto ao rompimento celular, tais como o uso de ultrassom e *potter* (homogeneizador). Dentre as metodologias testadas, a mistura de clorofórmio: metanol (2:1) associada ao uso de ultrassom se mostrou mais eficiente extraindo em média 19% de lipídios totais. Para a maximização da produtividade em biomassa foram avaliadas, por meio do planejamento experimental, as concentrações de nitrato de sódio e fosfato de potássio dibásico do meio de cultura. Posteriormente foi avaliado também o inóculo inicial de células. A máxima produtividade em biomassa ($0{,}032 g.L^{-1}.d^{-1}$) foi obtida nas seguintes condições: $1{,}21 g.L^{-1}$ $NaNO_3$, $4{,}49 g.L^{-1}$ de K_2HPO_4 e inóculo inicial de DO_{730nm} 0,2. Na avaliação final visando aumentar a produtividade em lipídios, condições limitantes de nitrato no meio extracelular possibilitaram um aumento no teor lipídico para 25,4% em peso seco de biomassa. A máxima produtividade final em lipídios alcançada foi $7{,}5 mg.g^{-1}.d^{-1}$. No presente trabalho foi possível aumentar a produtividade final em biomassa e em lipídios, bem como reduzir o tempo total de cultivo.

Palavras-chave: Microalga, Obtenção de biomassa, Conteúdo lipídico, Biodiesel, Planejamento experimental.

ABSTRACT

Raquel Rezende dos Santos

STUDY OF DIFFERENT CONDITIONS OF *CHLORELLA VULGARIS* CULTIVATION FOR IMPROVEMENT OF THE PRODUCTIVITY OF BIOMASS AND LIPIDS

Orientador: Donato Alexandre Gomes Aranda
Co-orientadora: Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

The use of lipids obtained from microalgae biomass has been described as a promising alternative to petro-diesel industry and involves steps such as the cultivation of microalgae, biomass separation, extraction and transesterification of lipids. The main purpose of this study was to evaluate different growing conditions of *Chlorella vulgaris* for improvement of the productivity for increasing productivity in biomass and lipids. To achieve its main objective, this work was divided into three stages: comparison of different methods of extracting total lipid; evaluation of different growth conditions to maximize productivity in biomass; and application of stress condition in order to increase productivity lipids. For extraction of total lipids were tested solvents ethanol, hexane and a mixture of chloroform and methanol in the ratio 2:1 to 1:2. For mixtures of chloroform and methanol were further evaluated as to the variations in cell disruption methods such as the use of ultrasound and potter (homogenizer). Among the tested methods, the mixture of chloroform: methanol (2:1) associated with the use of ultrasound was more efficient in extracting an average 19% of total lipids. For maximizing the productivity of biomass were evaluated by means of experimental design, the concentrations of sodium nitrate and potassium phosphate dibasic culture medium. Later, it was also evaluated initial inoculum of cells. The maximum biomass yield (0.032 $g.L^{-1}.d^{-1}$) was obtained under the following conditions: 1,21 $g.L^{-1}$ $NaNO_3$, 4,49 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4 and initial inoculums of DO_{730nm} 0,2. In the final evaluation in order to increase productivity lipids, nitrate limiting conditions in the extracellular medium allowed an increase in fat content to 25.4% by dry weight biomass. The final maximum lipid productivity achieved was 7,5$mg.g^{-1}.d^{-1}$. In the present work it was possible to increase the final productivity in biomass and lipids, as well as reduce the total time of cultivation.

Key words: Microalgae, Obtaining biomass, Lipid content, Biodiesel, Experimental design.

1 - INTRODUÇÃO **1**

2 - DESENVOLVIMENTO **2**

2.1 - BIOCOMBUSTÍVEIS 2

2.1.1 - Histórico do biodiesel 3

2.1.2 - Produção do biodiesel 4

2.2 - MICROALGAS 7

2.2.1 - Fotossíntese 8

2.2.2 - Síntese de biomoléculas 13

2.2.2.1 - Lipídios 15

2.2.3 - Potencialidades industriais das microalgas 18

2.2.3.1 - Aplicações industriais de lipídios de microalgas 20

2.2.4 - Espécie *Chlorella vulgaris* 23

2.3 - PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS 24

2.3.1 - Obtenção de biomassa (com elevador teor lipídico) 24

2.3.1.2 - Parâmetros de avaliação dos cultivos 27

2.3.2 - Separação da biomassa 28

2.3.3 - Extração de lipídios 29

2.3.4 - Transesterificação de lipídios 30

2.4 - JUSTIFICATIVA 32

3 - OBJETIVOS **33**

4 - MATERIAIS E MÉTODOS **34**

4.1 - MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO 35

4.2 - OBTENÇÃO DE BIOMASSA 35

4.2.1 - Seleção do método de extração lipídica mais eficiente 35

4.2.2 - Avaliação, por meio do planejamento experimental, de diferentes condições de cultivo visando à maximização da produção de biomassa. 36

4.2.3 - Aplicação de condição de estresse no meio de cultivo visando aumentar o teor lipídico na biomassa 37
4.2.4 - Parâmetros do cultivo: taxa específica de crescimento e produtividade em biomassa 38
4.3 - EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS 39
4.3.1 - Quantificação de triacilglicerídeos 41
4.3.2 - Perfil de ácidos graxos 42
4.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA 43
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO **44**
5.1 - SELEÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO LIPÍDICA 44
5.2 - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO 51
5.2.1 - Concentração de nitrato x Concentração de fosfato 51
5.2.2 – Concentração de nitrato x Inóculo inicial de células 56
5.3 - APLICAÇÃO DE CONDIÇÃO DE ESTRESSE NO MEIO DE CULTIVO 62
6 - CONCLUSÕES **68**
7 - BIBLIOGRAFIA **69**
8 - ANEXO **77**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhes da estrutura do cloroplasto. 9
Figura 2. Transferência de energia. 10
Figura 3. Transferência de elétrons e prótons na membrana tilacóide. 12
Figura 4. Observação microscópica de *Chlorella vulgaris*. 24
Figura 5. Biomassa de *C. vulgaris* obtida em garrafas do tipo pet de cristal. 35
Figura 6. Análise comparativa de diferentes protocolos de extração em relação ao teor de lipídios totais. 45
Figura 7. Análise comparativa de diferentes protocolos de extração em relação à concentração de TAGs. 47
Figura 8. Célula de *C. vulgaris* em diferentes fases de extração. 47
Figura 9. Cromatograma de íons do produto da reação de transesterificação. 49
Figura 10. Análise da concentração de nitrato sobre a produtividade em biomassa. 54
Figura 11. Análise da concentração de fosfato sobre a produtividade em biomassa. 55
Figura 12. Interação da concentração de nitrato e concentração de fosfato. 55
Figura 13. Análise da concentração de nitrato durante o segundo planejamento. 58
Figura 14. Análise do inóculo inicial de células sobre a produtividade em biomassa. 59
Figura 15. Interação do inóculo inicial de células e concentração de nitrato. 59
Figura 16. Produtividade em biomassa em relação ao inóculo inicial de células e à concentração de nitrato no meio de cultura. 60
Figura 17. Crescimento celular em diferentes etapas de cultivo. 63
Figura 18. Cromatograma de íons do produto da reação de transesterificação. A reação de transesterificação foi realizada a partir do lipídio presente em biomassa obtida na 1ª etapa de cultivo. 65
Figura 19. Cromatograma de íons do produto da reação de transesterificação. A reação de transesterificação foi realizada a partir do lipídio presente em biomassa obtida na 2ª etapa de cultivo (cultivo em deprivação de nitrato). 66

LISTA DE QUADROS

Quadro I. Reação de transesterificação de triacilglicerídeos. 5

Quadro II. O ciclo de Calvin..... 12

Quadro III. Síntese de componentes bioquímicos em *Chlorella vulgaris*..... 14

Quadro IV. Fluxograma da metodologia utilizada 34

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Ácidos graxos mais comumentes encontrados. 16
Tabela II. Teor lipídico de algumas microalgas. 17
Tabela III. Efeito de diferentes condições de cultivo no perfil lipídico de microalgas. 25
Tabela IV. Tabela de níveis da análise fatorial nitrato x fosfato. 36
Tabela V. Matriz de níveis para análise fatorial 22 com três pontos centrais. 36
Tabela VI. Tabela de níveis da análise fatorial nitrato x inóculo inicial de células. 37
Tabela VII. Diferentes protocolos de extração testados. 40
Tabela VIII. Composição percentual relativa dos lipídios extraídos com clorofórmio:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom. 49
Tabela IX. Matriz de níveis do planejamento experimental com valores preditos (em negrito) e experimentais da produtividade em biomassa, além da taxa de crescimento. 52
Tabela X. Análise de variância para a resposta. 52
Tabela XI. Resumo estatístico do modelo. 52
Tabela XII. Matriz de níveis do segundo planejamento experimental com valores preditos (em negrito) e experimentais da produtividade em biomassa, além da taxa de crescimento. 56
Tabela XIII. Análise de variância para a resposta obtida no segundo planejamento. 56
Tabela XIV. Resumo estatístico do modelo do segundo planejamento. 57
Tabela XV. Análise comparativa após 1ª e 2ª etapa de cultivo. 63
Tabela XVI. Composição percentual relativa dos lipídios presentes em biomassa obtida na 1ª etapa de cultivo. 65
Tabela XVII. Composição percentual relativa dos lipídios presentes em biomassa obtida na 2ª etapa de cultivo. 66

1 - INTRODUÇÃO

As consequências do uso de combustíveis fósseis, no meio ambiente, têm gerado a necessidade de uma maior produção de combustíveis derivados de matéria-prima renovável. As fontes alternativas de energia devem ser além de renováveis, eficientes, viáveis economicamente, e seguras para o meio ambiente. Nesse sentido, as microalgas têm sido estudadas como fontes de lipídio para produção de biodiesel.

Microalgas são seres fotossintetizantes presentes em sistemas aquáticos e que envolvem uma enorme diversidade de formas e funções biológicas. Caracterizadas por apresentarem maiores taxas fotossintéticas, quando comparadas a outros organismos fotossintetizantes, as microalgas vêm sendo descritas como importante biomassa devido à produção de compostos bioquímicos de alto valor comercial como polissacarídeos, proteínas, ácidos graxos e outros metabólitos secundários.

Dentre as vantagens da utilização de microalgas para produção de biodiesel destacam-se: a capacidade de fixar CO_2 possibilitando o ganho de créditos de carbono; alta produtividade quando comparadas a outras oleaginosas; possibilidade de serem cultivadas em água do mar e água salobra; não necessitam de terras aráveis; coleta pode ser diária sem regime de safra; teor e a qualidade dos ácidos graxos podem ser manipulados de acordo com o interesse comercial.

Muitos gêneros de microalgas já foram descritos pela capacidade de acumular uma grande quantidade de lipídios nos leucoplastos como é o caso de *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. e *Tetrasselmis* sp. Diferentes estudos têm concentrado esforços na aplicação de estratégias que visam aumentar o conteúdo lipídico e alterar o perfil de ácidos graxos de microalgas, variando condições de cultivo como intensidade de luz, concentração de CO_2, temperatura, concentração de nitrogênio, fósforo e ferro. Em outros estudos têm sido quantificado o teor de lipídio em função da variação metabólica seja em cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico; isso porque a composição bioquímica das microalgas pode variar, dependendo da espécie, das condições ambientais e do sistema de cultivo utilizado.

2 - DESENVOLVIMENTO

2.1 - Biocombustíveis

Em 2010 o consumo mundial de energia primária[1] foi estimado em torno de 12,717 milhões de toneladas equivalentes de petróleo. Os combustíveis fósseis representaram 81,1% desse consumo de energia, enquanto a energia nuclear e hidroelétrica corresponderam cerca de 5,7% e 2,3%, respectivamente (IEA, 2012). Sendo o Brasil um país não incluso nas estatísticas da *International Energy Agency* (IEA), a energia hidroelétrica representa 80,4% do consumo total de energia do país, enquanto os combustíveis fósseis e a energia nuclear correspondem a 9,1% e 2,9%, respectivamente (EPE, 2012).

Dado o atual processo tecnológico, as potenciais reservas e o aumento da exploração de novas reservas não convencionais (por exemplo, gás natural), é bastante provável que os combustíveis fósseis continuarão a estar disponíveis por um período de tempo considerável, embora possam ocorrer variações no fornecimento e no custo decorrente da evolução da geopolítica ao longo do tempo (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Dentre as consequências do uso dos combustíveis fósseis, as mudanças climáticas globais associadas à emissão de gases poluentes na atmosfera têm sido potenciais ameaças à natureza. A incerteza sobre a sustentabilidade do uso de combustíveis fósseis está relacionada não só ao esgotamento desse recurso, mas também aos efeitos negativos do dióxido de carbono (CO_2). Nesse sentido, a busca por fontes renováveis de energia tornou-se um dos principais desafios para a humanidade.

O biocombustível, produto derivado de biomassa renovável, pode substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis derivados de petróleo e gás natural. No Brasil, os dois principais biocombustíveis líquidos utilizados são o etanol, produzido via fermentação de açúcares e utilizado em veículos leves, e o biodiesel, obtido de óleos vegetais e gordura animal convertidos em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e utilizado principalmente em ônibus e caminhões (WESTBROOK, 2012).

---

[1] Fonte de energia que existe de forma natural na natureza e pode gerar energia de forma direta, destas destacam-se os combustíveis fósseis (fontes não renováveis) como carvão mineral, petróleo e gás natural; e as fontes renováveis como energia hídrica, solar, eólica, de biomassa, oceânica e geotérmica.

Com o interesse de acelerar o desenvolvimento de uma nova geração de biocombustíveis práticos, grandes centros de pesquisa multidisciplinares estão sendo criados, tais como o *Department of Energy Bioenergy Research Centers* nos EUA (http://www.jbei.org). Estes centros são integrados por universidades, laboratórios nacionais e empresas privadas e apresentam uma nova abordagem na compreensão de mecanismos biológicos subjacentes à produção de biocombustíveis, possibilitando que esses mecanismos sejam entendidos e aplicados a favor de desenvolver novas estratégias eficientes de bioenergia.

2.1.1 - Histórico do biodiesel

A história do biodiesel data de 1895, quando Rudolf Diesel e Henry Ford descobriram nos óleos vegetais um combustível. Durante a Exposição Universalle em Paris (1900), um motor diesel foi apresentado ao público funcionando com óleo de amendoim. Os primeiros motores tipo diesel eram de injeção indireta[2] e alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais e até mesmo por óleos de peixe. O primeiro registro do que hoje conhecemos como biodiesel foi uma patente belga (patente 422.877) de 1937 onde está escrita a utilização de óleo vegetal de palma e etanol via reação de transesterificação. Em 1938 o biodiesel foi utilizado pela primeira vez em uma linha de ônibus comercial entre Bruxelas e Louvain, na Bélgica (MEC, 2006).

No Brasil, o uso energético de óleos vegetais foi proposto em 1975, originando o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (PRO-ÓLEO), cujo objetivo era gerar um excedente de óleo vegetal capaz de tornar seus custos de produção competitivos com os do petróleo. Com o envolvimento de outras instituições de pesquisas, como a Petrobrás e o Ministério da Aeronáutica, foi criado o PRODIESEL em 1980. Motivado pela alta nos preços de petróleo, o Governo Federal lançou em 1983 o Programa de Óleos Vegetais (OVEG) sendo testada a utilização de biodiesel e misturas combustíveis em veículos que percorreram mais de um milhão de quilômetros. Essa iniciativa, coordenada pela Secretaria de Tecnologia Industrial, contou com a participação de

[2] Nestes tipos de motores, a combustão tem início em uma câmara secundária, propagando-se para a câmara principal. Grande parte da energia decorrente da queima quase instantânea do combustível acumulado durante o período de retardo é absorvida na pré-câmara.

institutos de pesquisa, de indústrias automobilísticas, de fabricantes de peças e de produtores de lubrificantes e combustíveis (MME, 2013).

Apesar das inúmeras iniciativas, foi a partir do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), lançado em dezembro de 2004 pelo Governo Federal, que o biodiesel avançou significativamente. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura obrigatória de 2% (B2) do biodiesel ao diesel convencional. Esse percentual foi ampliado sucessivamente até atingir 5% (B5) em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei nº 11.097, de 2005[3]. Desde o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (2004) até o fim de 2011, o Brasil deixou de importar 7,9 bilhões de litros de diesel, o equivalente a um ganho de cerca de US$ 5,2 bilhões na balança comercial brasileira (ANP, 2012a; BRASIL, 2013).

2.1.2 - Produção do biodiesel

De acordo com a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é definido como um combustível para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão[4], renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil. Entretanto, o óleo vegetal *in natura* é bem diferente do biodiesel, que deve atender à especificação estabelecida pela Resolução ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e biocombustíveis) n° 7/2008[5]. Para se tornar compatível com os motores a diesel, o óleo vegetal precisa passar por um processo químico chamado transesterificação, realizado nas instalações produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP.

---

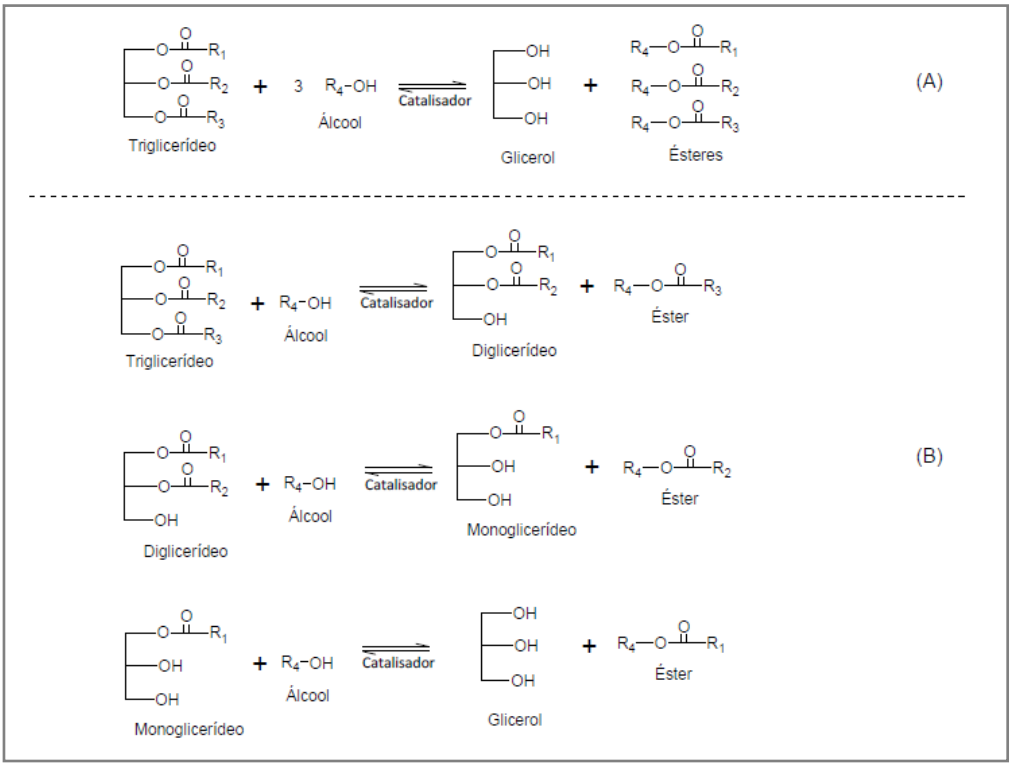
[3] Lei nº 11.097, de 13.01.2005 Art. 2º. Fica introduzido o biodiesel na matriz energética brasileira, sendo fixado em 5% (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. § 1º O prazo para aplicação do disposto no caput deste artigo é de 8 (oito) anos após a publicação desta Lei, sendo de 3 (três) anos o período, após essa publicação, para se utilizar um percentual mínimo obrigatório intermediário de 2% (dois por cento), em volume.

[4] O fluido de trabalho (normalmente ar) é comprimido sem ser misturado ao combustível e quando o combustível é injetado no fluido, comprimido e quente, ele inflama.

[5] Resolução ANP nº 7, de 19.03.2008 Art. 2º. Para efeitos desta Resolução, define-se: I – biodiesel – B100 – combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico, parte integrante desta Resolução; II – mistura óleo diesel/biodiesel – BX – combustível comercial composto de (100-X)% em volume de óleo diesel, conforme especificação da ANP, e X% em volume do biodiesel, que deverá atender à regulamentação vigente.

A molécula de óleo ou gordura, denominada quimicamente de triacilglicerídeo (TAG), é formada por três moléculas de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerina; a qual torna esse óleo mais denso, viscoso e inadequado para uso em motores de combustão do ciclo diesel convencional, pois pode provocar entupimentos e problemas com baixa qualidade de ignição (PARENTE, 2003; CARTONI, 2009).

Durante o processo de transesterificação as moléculas de TAG reagem com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) geralmente na presença de um catalisador (ácido ou alcalino), formando ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos graxos e glicerina. A glicerina pode ser utilizada na produção de tintas, adesivos, produtos farmacêuticos e têxteis, dentre outros (CARTONI, 2009). A reação de transesterificação ocorre em três etapas, conforme quadro I: inicialmente as moléculas de TAG são convertidas em diacilglicerídeos, depois em monoacilglicerídeos e, finalmente em glicerol, sendo formados os ésteres metílicos ou etílicos.



Quadro I. Reação de transesterificação de triacilglicerídeos. (A) Transesterificação simplificada. (B) Transesterificação com etapas intermediárias, onde R_1, R_2 e R_3 representam radicais de hidrocarbonetos saturados ou insaturados e R_4 representa radical metil ou etil. Fonte: SOARES, 2010.

A produção de biodiesel através da transesterificação alcalina é a rota mais utilizada industrialmente devido às razões econômicas, ao menor tempo de reação e aos melhores rendimentos obtidos comparados à transesterificação ácida. Em relação ao álcool, o metanol é mundialmente mais utilizado em função da maior disponibilidade, baixo custo e maior conversão dos TAGs em biodiesel. O éster metílico de ácido graxo é descrito mundialmente como FAME (*fatty acid methyl ester*) e comumente referido como biodiesel (KHALIL, 2006).

Existem diferentes espécies de oleaginosas que podem ser utilizadas para produzir o biodiesel, dentre as quais destacam-se mamona, palma, canola, girrasol, amendoim, soja e algodão. Matérias-primas de origem animal, como o sebo bovino e gorduras de frango e de porco, também são utilizadas na fabricação do biodiesel. Outras fontes de matérias-primas para as quais o processamento ainda não é bem estabelecido são as gorduras provenientes de esgotos e estações de tratamento de efluentes, e o óleo de microalgas (MEC, 2006).

O óleo de soja tem sido a matéria-prima mais utilizada para a fabricação do biodiesel no Brasil, seguida do sebo bovino e do óleo de algodão. No mês de novembro de 2012, a participação ficou em 70,63% para o óleo de soja, 20,88% para o sebo, 4,61% para óleo de algodão e 2,48% para outras matérias-primas como óleo de fritura usado, gordura de porco, gordura de frango e óleo de canola (ANP, 2012b). A escolha da matéria-prima constitui um fator crítico no custo final do biodiesel, isso porque a matéria-prima representa de 50 a 85% do custo total do processo. Portanto, para minimizar o custo do biodiesel, é importante fazer uma avaliação da matéria-prima em relação ao rendimento, qualidade e aproveitamento dos subprodutos (TEIXEIRA & MORALES, 2006; SONG, FU & SHI, 2008).

As principais vantagens do uso do biodiesel em relação ao petrodiesel são: seu caráter renovável, biodegradável e de baixa toxicidade; seu maior ponto de fulgor (proporciona manuseio e armazenamento mais seguro); a boa lubricidade (reduz o desgaste do motor); a possibilidade de aproveitamento de rejeitos (gorduras de animais e óleo de cozinha usado, por exemplo); isenção de enxofre e aromáticos; a menor emissão de material particulado (monóxido de carbono e óxidos sulfúricos); e a geração de créditos de carbono vinculados ao mecanismo de desenvolvimento limpo decorrentes do Protocolo de Kioto (PARENTE, 2003; VISCARDI, 2005; SONG, FU & SHI, 2008).

Conforme dados de pesquisa do Instituto Brasileiro de Economia da Fundação Getúlio Vargas (IBRE/FGV), com o uso do B5, na cidade de São Paulo foram economizados R$ 11 milhões na saúde pública, entre os anos de 2010 e 2011, referentes a tratamentos de doenças respiratórias. Estima-se que com o B20 sejam economizados R$ 71 milhões na saúde pública, além de serem evitados 77 mil internações e 11 mil óbitos no ano de 2020. Isso porque a poluição atmosférica nos centros urbanos é um fator responsável pelo aumento na incidência de doenças respiratórias e cardiovasculares (CIFUENTES *et al*., 2001).

Como desvantagem, o preço do biodiesel atualmente é maior do que o petrodiesel e a queima do biodiesel emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NOx), que são prejudiciais à saúde (BAN-WEISS *et al*., 2007).

A venda de diesel B5 é obrigatória em todos os postos que revendem óleo diesel, e é sujeita à fiscalização pela ANP. A adição de até 5% de biodiesel ao diesel de petróleo foi amplamente testada, dentro do programa de testes coordenado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, que contou com a participação da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea). Os resultados demonstraram não haver a necessidade de qualquer ajuste ou alteração nos motores e veículos que utilizem essa mistura. Outras misturas também vêm sendo estudas e apoiadas pela Resolução ANP nº2/2011, a qual permite o uso experimental do óleo diesel B6 a B20 em frotas cativas[6] ou em equipamento industrial específico.

2.2 - Microalgas

Microalgas são seres fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido à sua simples estrutura celular. Conhecidas como uma das formas de vida mais antigas do planeta, esses microrganismos envolvem uma enorme diversidade de formas e funções ecológicas (MATA, MARTINS & CAETANO**,** 2010). A definição de microalgas abrange tanto organismos procarióticos (por exemplo, cianobactérias), como organismos eucarióticos, os quais apresentam uma variedade de classes definidas pelo tipo de pigmento, ciclo de vida e estrutura celular. Dentre outras classes é possível citar as algas verdes, algas vermelhas e diatomáceas (BRENNAN &

[6] Quantidade de veículos pertencentes ou a serviço de uma pessoa jurídica.

OWENDE, 2010). Estima-se que mais de 50.000 espécies existam, mas somente um número limitado de aproximadamente 30.000 espécies já foram estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004).

São descritos como habitat natural das microalgas os oceanos abertos, as costas rochosas e o meio aquático de água doce como rios, lagos, valas e lagoas (STENGEL, CONNAN & POPPER, 2011). Em relação ao metabolismo, as microalgas podem apresentar metabolismo autotrófico, quando a luz é a única fonte de energia, sendo esta convertida em energia química através da fotossíntese, heterotrófico, quando um composto orgânico é a única fonte de energia e mixotrófico, quando além da luz como fonte de energia também podem ser utilizados compostos orgânicos como fonte de carbono. Muitas espécies são capazes de alterar o metabolismo de acordo com as mudanças ambientais (RYM *et al*., 2010).

Uma das características mais relevantes das microalgas é a capacidade de utilizar CO_2 proveniente de um processo poluidor, o que proporciona a redução da emissão de gás carbônico na atmosfera. A conversão do CO_2 e a utilização da energia luminosa, através do processo de fotossíntese, permitem a produção de carboidratos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos (CHISTI, 2007). Dessa forma, a biomassa e os extratos da biomassa de microalgas vêm ganhando destaque no mercado mundial, sendo aplicados de diferentes formas como na produção de proteínas, ésteres, carotenoides, clorofila, enzimas, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas (RICHMOND, 2004).

2.2.1 - Fotossíntese

O processo de fotossíntese consiste na fixação de CO_2 e liberação de gás oxigênio (O_2). Esse processo está associado a sistemas membranosos especiais, denominados membranas fotossintéticas. Em eucariotos, as membranas fotossintéticas estão relacionadas às organelas intracelulares denominadas cloroplastos. Esses sistemas de membranas fotossintéticas são denominados de tilacóides (figura 1) (HALL & RAO, 1994).

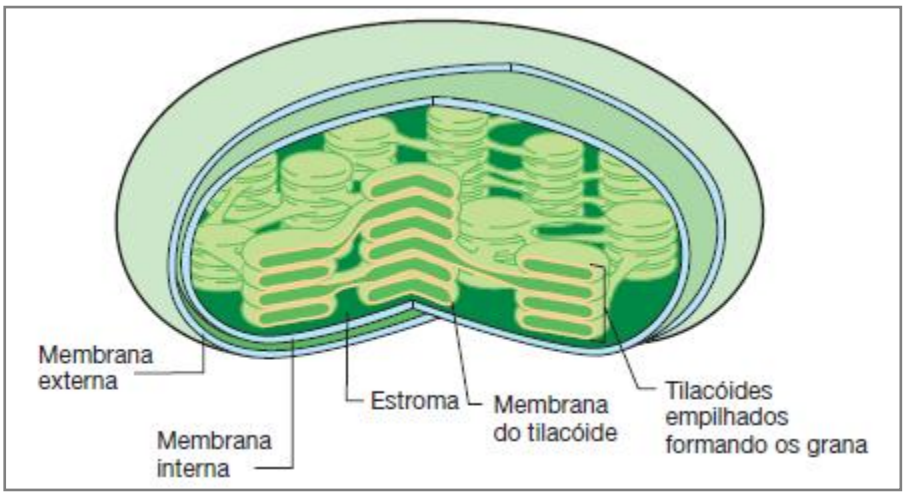


Figura 1. Detalhes da estrutura do cloroplasto. Ilustração das convoluções das membranas dos tilacóides definindo um espaço interno, denominado estroma, e originando estruturas que correspondem às membranas empilhadas, denominadas grana. Fonte: MADIGAN, MARTINKO & PARKET, 2007.

O primeiro evento necessário à fotossíntese é a absorção de energia luminosa pelos pigmentos, os quais fazem parte do complexo antena nas membranas tilacóides. A antena distal, formada pelos pigmentos acessórios como carotenoides, ficoeritrina, ficocianina, clorofila *b* e clorofila *c*, absorve a energia luminosa em menor comprimento de onda e a transfere para a antena proximal, formada pela clorofila *a* (figura 2) (HALL & RAO, 1994).

Os pigmentos devem estar localizados de modo a não estarem muito perto uns dos outros (para que um pigmento não seja ativado pela excitação de outro), nem muito longe (para não dificultar a excitação e transmissão da energia). Em condição limitante de luz, a quantidade de pigmentos é aumentada como tentativa de compensar a ausência de luz. Pelo mesmo motivo, alta intensidade de luz reduz a quantidade de pigmentos o que é caracterizado como Fotoaclimatação (CAMACHO RUBIO *et al*., 2003). No caso da Fotoinibição, ocorre uma redução na capacidade fotossintética induzida por pela elevada irradiância nos tecidos fotossintetizantes. Em muitos casos a fotoinibição é reversível, a taxa fotossintética pode ser restabelecida depois de um logo período em qual o organismo está exposto à baixa irradiância (HALL & RAO, 1994).

Na antena proximal, os elétrons são transferidos para o centro de reação do fotossistema II (PS II). A energia absorvida pela antena (fase fotofísica) é utilizada na fase fotoquímica (fixação de CO_2) para a realização de inúmeras reações químicas. Caso o

centro de reação não receba essa energia[7], a mesma deve ser dissipada na forma de calor ou fluorescência; nesse último é a antena proximal que fluoresce. A dissipação da energia faz parte de um sistema de defesa para impedir a formação de espécies reativas de oxigênio de modo a danificar a proteína D_1 do PS II caracterizando um Fotodano (CAMACHO RUBIO *et al*., 2003).

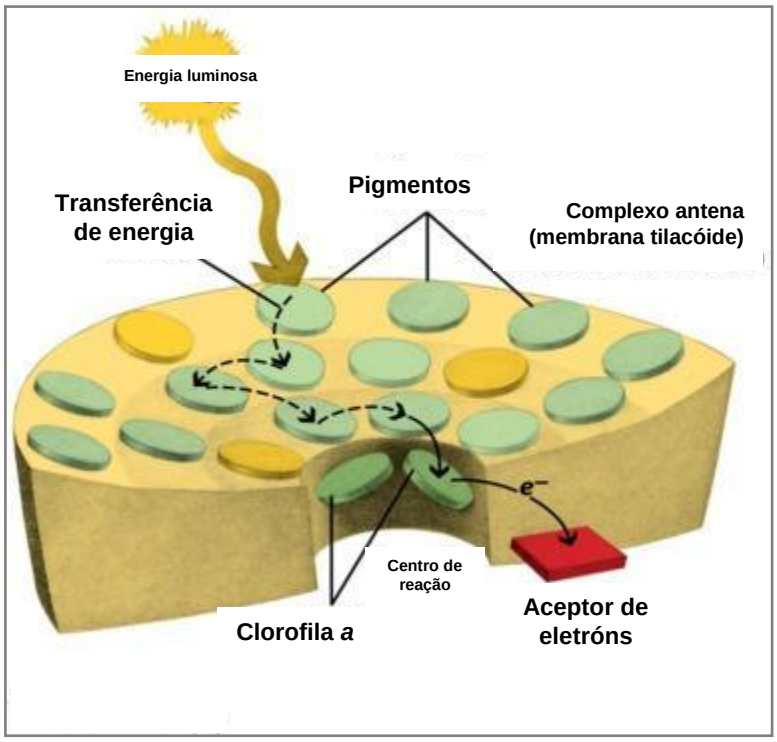


Figura 2. Transferência de energia. Pigmentos absorvem energia no complexo antena e a transferem até o centro de reação. Fonte: TAIZ & ZEIGER, 2006.

O complexo central do PS II é formado por duas proteínas integrais denominadas D_1 e D_2, as quais formam o heterodímero D_1/D_2. Associados à proteína D_1 encontram-se a clorofila *P680*, a feofitina (*Phe*), a plastoquinona *B* (Q_B) e resíduos de tirosina. A proteína D_2 mantém sua estrutura ligada à plastoquinona *A* (Q_A). No centro de reação, o elétron é transmitido ao seu receptor primário no PS II (*P680*). O elétron excitado é transferido na seguinte ordem: *P680*, *Phe*, Q_A, Q_B e citocromo b_6/f. Durante a fase fotoquímica, também são utilizados os elétrons oriundos do foto-oxidação da molécula de água (fase fotofísica),

[7] Quando ainda está processando outro elétron. Ocorre em casos de fotoinibição, quando a quantidade de fótons emitidos é maior que a capacidade de absorção do aparato fotossintético.

nesse caso os elétrons são transferidos até a *P680* por meio de resíduos de tirosina. Para cada duas moléculas de água oxidadas, ocorre a liberação de uma molécula de O_2 (EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008).

O citocromo b_6/f transfere elétrons do plastoquinona reduzida (Q_BH_2) até a plastocianina e esta os transfere para a clorofila *P700*, no centro de reação do fotossistema I (PS I). O PS I catalisa a oxidação da plastocianina e a redução da ferrodoxina. No PS I existe ainda a enzima NADP *oxiredutase*, que reduz $NADP^+$ a $NADPH_2$ completando a sequência do transporte de elétrons. A oxidação da Q_BH_2 e da molécula de água permite a transferência de prótons com criação de um gradiente eletroquímico na membrana. Esse processo é essencial para síntese de ATP pela enzima ATP*ase*. A figura 3 demonstra a transferência de elétrons e prótons na membrana tilacóide (EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008).

Tanto as moléculas de $NADPH_2$ como as moléculas de ATP são utilizadas durante as reações de fixação de CO_2 pelas enzimas-chave *ribulose* 1,5 *bifosfato carboxilase* (*RubisCO*) e *fosforibuloquinase*. A fixação de CO_2 ocorre através do ciclo de Calvin, quando na primeira etapa, a *RubisCO* catalisa a formação de duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (AFG) a partir de ribulose bifosfato e CO_2, como ilustrado no quadro II. Em seguida o AFG é fosforilado e reduzido a um intermediário chave da glicólise, o gliceraldeído 3-fosfato. A partir dessa etapa, a glicose pode ser produzida pela reversão das etapas iniciais da glicólise (HALL & RAO, 1994; EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008).

Para que a *RubisCO* promova a incorporação de seis moléculas de CO_2, por exemplo, há a necessidade de seis moléculas de ribulose bifosfato que atuam como aceptoras. Essa reação leva a formação de doze moléculas de AFG, as quais atuam como esqueleto de carbono na formação de seis novas moléculas de ribulose bifosfato e de uma molécula de hexose, utilizada na biossíntese celular. Uma séria complexa de rearranjos origina as seis moléculas de ribulose 5-fosfato, a partir da quais as seis ribuloses bifosfato serão geradas. A última etapa dessa regeneração corresponde a fosforilação da ribulose 5-fosfato catalisada pela enzima *fosforibuloquinase.* Assim como a *RubisCO*, essa enzima também é exclusiva do ciclo de Calvin (EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008).

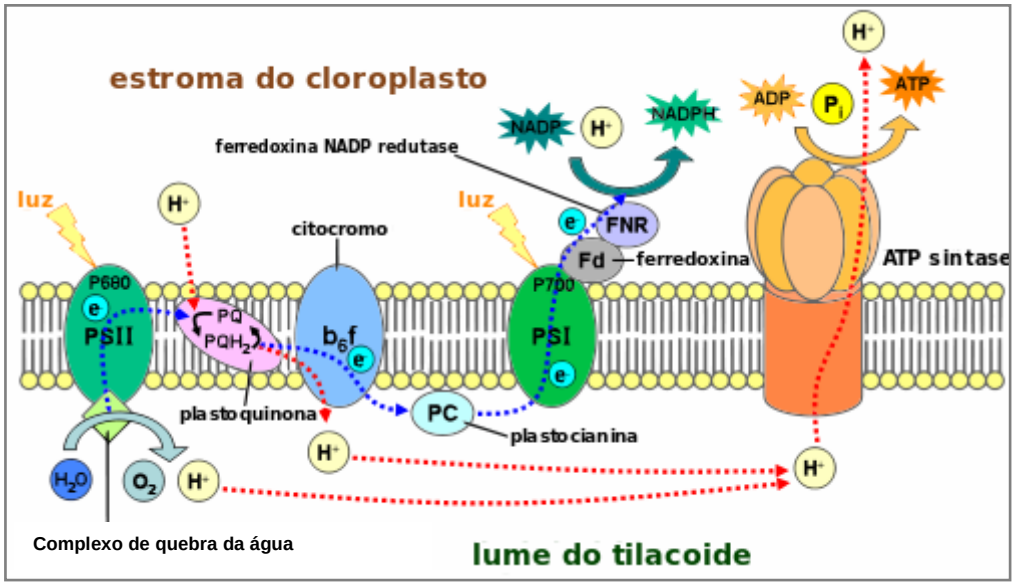
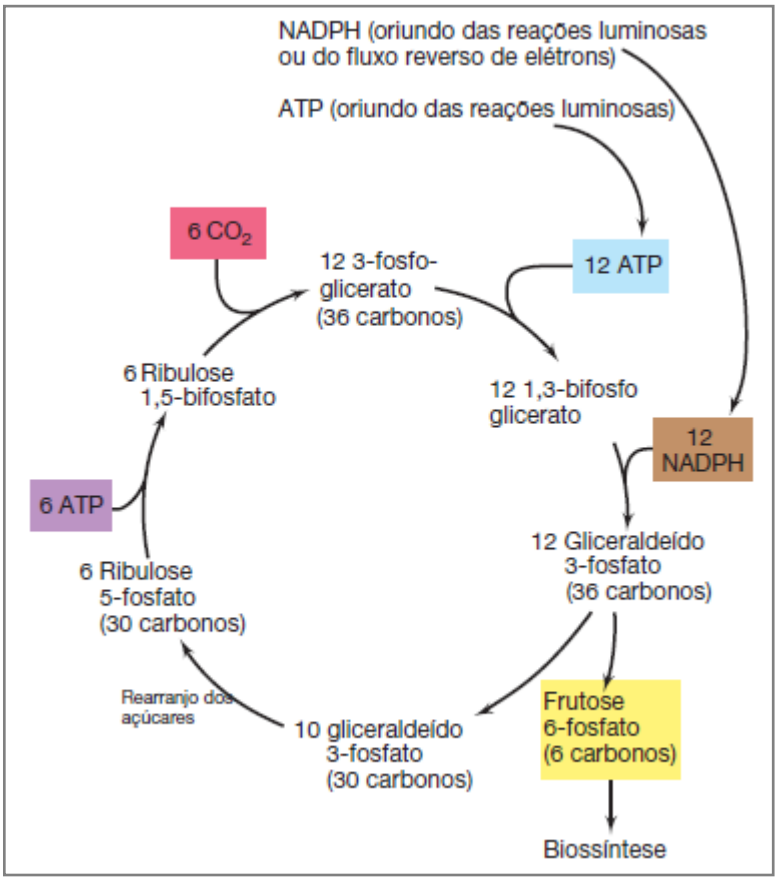


Figura 3. Transferência de elétrons e prótons na membrana tilacóide. As linhas tracejadas em azul representam a transferência de elétrons, enquanto as linhas vermelhas representam a transferência de prótons. Fonte: WIKIPEDIA, 2013.



Quadro II. O ciclo de Calvin. Para cada seis moléculas de CO_2 incorporadas, uma frutose 6-fosfato é produzida. Fonte: MADIGAN, MARTINKO & PARKET, 2007.

2.2.2 - Síntese de biomoléculas

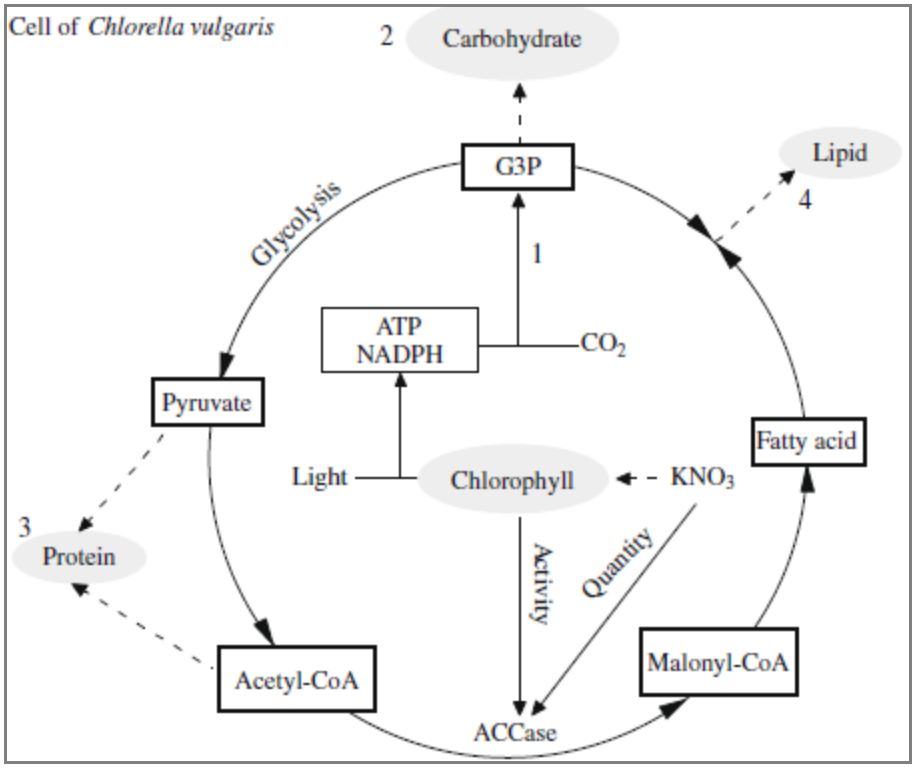
A síntese de biomoléculas está envolvida com uma séria de reações enzimáticas que originam a formação de carboidratos, proteínas e lipídios, conforme demonstrado no quadro III. É válido lembrar que outras moléculas também são sintetizadas tais como nucleotídeos, pigmentos, vitaminas e compostos fenólicos.

Em uma primeira etapa de biossíntese ocorre a fotossíntese seguida do ciclo de Calvin (descritos na seção anterior). Esses processos resultam na molécula de gliceraldeído 3-fosfato (G3P) que via reversão das etapas iniciais da glicólise pode ser convertida em carboidrato a ser utilizado para biossíntese celular.

Os carboidratos em microalgas podem ser encontrados na forma de glicose, celulose, amido, pectina, xilana, manana e outros polissacarídeos (STENGEL, CONNAN & POPPER, 2011). Muitos polissacarídeos são metabolicamente ativos, seja como componente estrutural da parede celular; portanto estando envolvidos no crescimento celular, ou como molécula de armazenamento, sujeitos às alterações estruturais durante o ciclo de vida (CRAIGIE, 1990).

Parte da molécula G3P segue a rota convencional da glicólise sendo convertida na molécula de piruvato. Esse processo é catalisado pelas enzimas *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*, *fosfogliceroquinase*, *fosfoglicerato mutase*, *enolase* e *piruvato quinase*, que convertem gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, 1,3-bifosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato e fosfoenolpiruvato em piruvato, respectivamente. A enzima *piruvato desidrogenase*, na presença da coenzima A, converte o piruvato em acetil-CoA. Durante esse processo ocorre a síntese de aminoácidos usados como precursores de proteínas (MING LV *et al*., 2010).

A partir da molécula de acetil-CoA ocorre a produção de Malonil-CoA, catalisada pela enzima *acetil-CoA carboxilase* (*ACCase*). A partir do malonil-CoA começa o alongamento da cadeia de ácido graxo que em ciclo contínuo permite a acumulação de lipídios. Para a síntese de ácidos graxos é de fundamental importância a ação da enzima *ACCase*, sendo primordial a atividade e concentração dessa enzima. Em relação à atividade enzimática, esta pode ser regulada pelo pH do estroma do cloroplasto, bem como por moléculas de $NADH_2$. À medida que ocorre a fotossíntese, o transporte de prótons (H^+) do estroma para a membrana tilacóide resulta no aumento do pH de 7,0 para 8,0 (MING LV *et al*., 2010).



Quadro III. Síntese de componentes bioquímicos em *Chlorella vulgaris*. (1) A energia luminosa é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes é transformada em energia química, sendo esta utilizada na biofixação de CO_2 de modo a produzir gliceraldeído 3-fosfato (G3P). (2) Síntese de carboidrato a partir de G3P. (3) Através da glicólise, parte da molécula G3P é convertida em piruvato e esta convertida em acetil-CoA com a síntese proteínas. (4) A enzima *Aceti-Coa Carboxilase* (*ACCase*) catalisa a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA , levando ao acúmulo de lipídios. A quantidade de nitrogênio regula a concentração da *ACCase*, bem como o pH no estroma do cloroplasto regula a atividade dessa enzima. Fonte: MING LV *et al*., 2010.

Já a concentração enzimática é regulada pela transcrição e tradução do RNA sendo, no entanto, necessário nitrogênio (na forma de nitrato de potássio, por exemplo) para a síntese de aminoácidos e consequentemente síntese protéica (MING LV *et al*., 2010). Sendo o nitrogênio essencial, condições limitantes desse componente impossibilitam a síntese de outras proteínas envolvidas na divisão celular. Quando as células não são mais capazes de se dividir, os lipídios são sintetizados e armazenados dentro das células como material de reserva (SINGH, NIGAM & MURPHY, 2011). Por esse motivo, fica fácil perceber que a quantidade de nitrogênio intracelular é um fator relevante envolvido na biossíntese de lipídios. Se por um lado condições limitantes de nitrogênio favorecem a biossíntese de lipídios intracelulares em células já desenvolvidas, por outro, podem afetar o crescimento celular de novas células. Nesse sentido, aumentar o teor lipídico e obter biomassa simultaneamente torna-se um desafio para pesquisadores da área.

2.2.2.1 - Lipídios

Os lipídios constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem a sua insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos como característica definidora. Diferentes lipídios apresentam diferentes funções biológicas. Em muitos organismos, óleos e gorduras são as formas principais de armazenar energia, enquanto os fosfolipídios e os esteróis representam perto de metade da massa das membranas biológicas. Outros lipídios, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham papéis cruciais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem energia luminosa, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes e mensageiros intracelulares (NELSON & COX, 2010).

Os lipídios envolvidos no armazenamento e transporte de energia nas microalgas são compostos, do ponto de vista químico, altamente reduzidos e derivados dos ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos de 4 a 36 átomos de carbono. Em alguns ácidos graxos essa cadeia é totalmente saturada (SFAs - não contém duplas ligações), outros contêm uma (monoinsaturados) ou mais duplas ligações (poli-insaturados ou PUFAs). Enquanto os ácidos graxos saturados são sólidos em temperatura ambiente (classificados como gordura), os insaturados de cadeia carbônica com o mesmo comprimento são líquidos (óleos), apresentando menor ponto de fusão (HU *et al*., 2008).

A estrutura de um ácido graxo pode ser indicada mediante uma notação simplificada, na qual se escreve o número de átomos de carbono e o número de duplas ligações, separados por dois pontos. Por exemplo, o ácido palmítico que contém 16 átomos de carbono e é saturado, é abreviado como 16:0 ou C_{16}:0; já o ácido oléico que contém 18 átomos de carbono e uma dupla ligação, é abreviado como C18:1 ou C_{18}:1. As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm são determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica. Embora a maior parte dos ácidos graxos esteja na forma esterificada com o glicerol, é correto lembrar que alguns ácidos graxos também são encontrados como substâncias livres. A tabela I lista os ácidos graxos mais comumente encontrados (NELSON & COX, 2010).

Os lipídios mais simples constituídos de ácidos graxos são os triacilglicerídeos (TAG) ou triglicerídeos. As moléculas de TAG são compostas de três ácidos graxos, cada um em ligação éster com uma única hidroxila do glicerol. Na maioria das células

eucarióticas as moléculas de TAG formam uma fase separada de gotículas microscópicas oleosas no citosol, servindo como depósitos de combustível metabólico (HU *et al*., 2008).

Como combustíveis estocados, as moléculas de TAG apresentam duas vantagens significativas sobre os carboidratos: sendo os átomos de carbono dos ácidos graxos mais reduzidos que aqueles dos açúcares, a oxidação dos TAG libera uma quantidade de energia maior que a liberada pelos carboidratos; além do fato de serem moléculas hidrofóbicas, logo o organismo que transporta gordura como combustível não tem que carregar o peso extra da água de hidratação que está sempre associada aos polissacarídeos armazenados (NELSON & COX, 2010).

Tabela I. Ácidos graxos mais comumentes encontrados. Em negrito os ácidos graxos insaturados. Fonte: VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996**.**

Nome usual	Nome IUPAC
Ác. butírico	Ác..butanóico
Ác. valérico	Ác. pentanóico
Ác. capróico	Ác. hexanóico
Ác. caprílico	Ác. octanóico
Ác. cáprico	Ác. decanóico
Ác. láurico	Ác. dodecanóico
Ác. mirístico	Ác. tetradecanóico
Ác. palmítico	Ác. hexadecanóico
Ác. esteárico	Ác. octadecanóico
Ác. araquídico	Ác. eicosanóico
Ác. linocérico	Ác. tetracosanóico
Ác. palmitoléico (C_{16}:1)	**Ác. palmitoléico**
Ác. oléico (C_{18}:1)	**Ác. oléico**
Ác. linoléico (C_{18}:2)	**Ác. linoléico**
Ác. linolênico (C_{18}:3)	**Ác. linolênico**
Ác. araquidônico (C_{20}:4)	**Ác. araquidônico**

As microalgas podem ser consideradas uma fonte alternativa de lipídios, por apresentarem um teor lipídico variando entre 15-75% de seu peso seco, a depender da forma de cultivo (tabela II) (CHISTI, 2007). Em alguns casos, quando conteúdo de óleo atingiu 75% de peso em relação à massa seca, ocorreu um baixo crescimento celular, como é o caso de *Botryococcus braunii*, por exemplo. Para outras microalgas, com níveis de óleo entre 20-50%, como *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., e *Tetraselmis* sp., foram relatados maiores crescimentos (MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

Tabela II. Teor lipídico de algumas microalgas. Fonte: CHISTI, 2007.

Microalga	Conteúdo lipídico (% massa seca)
Botryococcus braunii	25-75
Chlorella sp.	28-32
Crypthecodinium cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16-37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25-33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20-35
Nannochloropsis sp.	31-68
Neochloris oleoabundans	35-54
Phaeodactylum tricornutum	20-30
Nitzschia sp.	45-47
Schizochytrium sp.	50-77
Tetraselmis sueica	15-23

Muitos são os trabalhos que têm relatado um aumento no teor lipídico em função da redução das concentrações de nitrato no meio extracelular. Em 2009, Converti e colaboradores avaliaram a influência de diferentes concentrações de nitrato de sódio no teor lipídico das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* cultivadas a

70μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$. A microalga marinha, *N. oculata*, foi avaliada em concentrações de 0,075g.L^{-1}, 0,15g.L^{-1} e 0,30g.L^{-1} de $NaNO_3$ no meio de cultura; enquanto que a espécie dulcícola, *C. vulgaris*, foi cultiva em 0,375 g.L^{-1}, 0,75g.L^{-1} e 1,5g.L^{-1} de $NaNO_3$. Para *C. vulgaris*, foi observado um aumento na produtividade em lipídios de 8,16mg.L^{-1}.d^{-1} para 20,30mg.L^{-1}.d^{-1} ao reduzir a concentração de 1,5g.L^{-1} para 0,375g.L^{-1} de $NaNO_3$. Já no caso de *N oculata*, a redução de 0,30g.L^{-1} para 0,075g.L^{-1} de $NaNO_3$ no meio de cultura aumentou de 10,01mg.L^{-1}.d^{-1} para 16,41mg.L^{-1}.d^{-1} a produtividade em lipídios. Contudo, neste último caso também foi observada redução da taxa de crescimento celular, a qual passou de 0,13d^{-1} para 0,10$d^{-1.}$

Ming Lv e colaboradores, em 2010, descreveram a necessidade de diferentes condições de cultivo para assegurar uma alta produção de biomassa aliada a um alto teor lipídico. Para tal, as microalgas devem ser cultivadas sob condições favoráveis e posteriormente estressadas nutricionalmente com concentrações reduzidas de nitrato. Os autores analisaram o crescimento celular e o conteúdo lipídico de *Chlorella vulgaris* (cultivada sob aeração com enriquecimento de CO_2 a 1,0%, intensidade de luz de 60μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e temperatura de 25ºC) nas concentrações de 0,2mM, 1,0mM, 3,0mM e 5,0mM de nitrato de potássio no meio de cultura. A concentração celular aumentou de 0,4g.L^{-1} para 1,2g.L^{-1} com o aumento de 0,2mM para 5,0mM de KNO_3, em contrapartida o conteúdo lipídico reduziu de 22,5% para 15,9% em peso seco de biomassa.

Em 2011, Ördög e colaboradores acompanharam a concentração de lipídios durante 15 dias de cultivo da espécie *Chlorella minutissima*, nas concentrações de 0,007g.L^{-1}, 0,021g.L^{-1}, 0,035g.L^{-1}, 0,07g.L^{-1} e 0,7g.L^{-1} de nitrogênio no meio de cultura. A microalga foi cultivada sob aeração com enriquecimento de CO_2 a 1,5%, 130μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ com ciclos claro e escuro 14:10 e 25ºC. Ao final dos 15 dias de cultivo, a microalga mantida a 0,7g.L^{-1} de nitrogênio apresentou uma concentração celular de 2,88g.L^{-1} e 11,2% de conteúdo lipídico. Já a microalga cultivada em 0,007g.L^{-1} de nitrogênio apresentou concentração celular de 0,97g.L^{-1} e teor lipídico de 43,3%.

2.2.3 - Potencialidades industriais das microalgas

De modo geral, o aumento da demanda de produtos obtidos a partir das microalgas deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes,

ácidos graxos poli-insaturados e biomoléculas imunologicamente ativas. Empresas de produção de compostos de microalgas vêm desenvolvendo novos sistemas de produção de biomassa e utilização dessa biomassa em produtos diferenciados (PULZ & GROSS, 2004).

Os polissacarídeos de microalgas são importantes, na indústria alimentícia, por apresentarem alta digestibilidade e ausência de limitação ao uso do pó de microalgas em alimentos (RICHMOND, 2004). Esses polissacarídeos também são moléculas de importância farmacológica. Resultados de programas de *screening* para testar efeitos imunologicamente relevantes dessas macromoléculas *in vitro* têm mostrado que certos polissacarídeos altamente sulfatados podem desencadear a resposta humoral do sistema imune humano (NAMIKOSHI, 1996).

Em relação às proteínas, o elevado conteúdo protéico de várias espécies de microalgas é uma das razões para considerar esses microrganismos como uma fonte não convencional de proteínas (RICHMOND, 2004), as quais estão presentes em diversas formas e localizações celulares como, por exemplo, componente celular, enzimas, ligadas a pigmentos, ligadas a carboidratos, dentre outros (SPOLAORE *et al*., 2006). Não apenas o teor protéico é importante, mas também o fato do aminoácido padrão de quase todas as microalgas ser comparado favoravelmente com o de outras proteínas alimentares. À medida que as células são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, podem fornecer os essenciais para alimentação de seres humanos e animais (GUIL-GUERRERO *et al*., 2004).

As microalgas também representam uma valiosa fonte de quase todas as vitaminas essenciais (A, B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico), o que agrega valor nutricional a sua biomassa (GUIL-GUERRERO *et al*., 2004). Assim como muitos outros constituintes intracelulares, o teor de vitaminas pode variar em função de fatores ambientais, estratégias de separação da biomassa e método de secagem das células (BROWN *et al*., 1999). Outros importantes constituintes são os pigmentos como a clorofila, os carotenoides e ficobiliproteínas. Essas moléculas têm uma ampla variedade de aplicações comerciais, desde a utilização como corante natural em alimentos até a utilização como moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias em cosméticos (SPOLAORE *et al*., 2006).

2.2.3.1 - Aplicações industriais de lipídios de microalgas

Dentre as inúmeras biomoléculas de microalgas utilizadas industrialmente, destacam-se os lipídios, os quais podem ser comercializados pela indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e, mais recentemente, indústria petro-química.

Os PUFAs, em geral cadeias carbônicas maiores do que 18 átomos de carbono, são essenciais para a saúde humana e animal e devem ser adquiridas a partir de fontes alimentares. Peixes e óleo de peixes são usualmente empregados na obtenção de PUFAs; no entanto, os produtos extraídos dessas fontes têm levantado discussões no que diz respeito à segurança alimentar devido ao acúmulo de toxinas por peixes. Além disso, a utilização dessas fontes como aditivo alimentar é limitado em função de problemas associados ao forte odor, sabor desagradável e baixa estabilidade oxidativa. Para certas aplicações, o óleo de peixe é inapropriado devido ainda à presença de ácidos graxos mistos (TAGs com dois ou mais ácidos graxos diferentes). Sendo os PUFAs originários de peixes que consomem as microalgas em ambientes oceânicos, é lógico considerar as microalgas como potenciais fontes de PUFAs (SPOLAORE *et al*., 2006).

Atualmente, nas áreas alimentícia e farmacêutica, verifica-se uma tendência em agrupar os ácidos graxos insaturados em famílias conhecidas como ω (ômega). Dentre os ácidos graxos de microalgas, as famílias do ω3 e ω6 são de particular interesse e essas se diferenciam em relação às suas estruturas químicas. Enquanto os ácidos graxos da família ω3 contem sua primeira ligação dupla entre o 3º e 4º átomo de carbono, os ácidos graxos da família ω6 contem sua primeira ligação dupla entre o 6º e 7º átomo de carbono. Dentre alguns ácidos graxos dessas famílias se destacam: o ácido eicosapentaenóico (EPA) com ação anti-inflamatória; os ácidos docosahexaenóico (DHA) e palmitoléico que reduzem o risco de certas doenças cardíacas; o ácido oléico com capacidade antioxidante; e o ácido linolênico com atividade antimicrobiana (LOURENÇO, 2006).

Em 2003 a *Nutrinova* (www.nutrinova.com; Frankfurt, Alemanha) anunciou a produção de DHA utilizando a biotecnologia de microalgas. Para tal, a empresa tem cultivado *Ulkenia* sp. em fermentadores de $80m^3$ para obter o óleo que é comercializado com o nome de DHActive® e utilizado como um suplemento dietético em alimentos e bebidas para adultos, grávidas, lactantes, bem como direcionado para tratamentos da saúde cardiovascular (SPOLAORE *et al*., 2006; PULZ & GROSS, 2004).

Na indústria de cosméticos, algumas espécies de microalgas como *Arthrospira* e *Chlorella*, têm sido cultivadas para o desenvolvimento de produtos direcionados aos cuidados do rosto, corpo e cabelo. Esses produtos utilizam os ácidos graxos para ação emoliente, espessante e emulsificante na elaboração de cremes. Os emolientes são considerados os principais ingredientes dos produtos cosméticos, pois são os grandes responsáveis pelo aspecto sensorial do produto. Uma correta seleção dos emolientes proporciona uma melhor experiência sensorial para o consumidor (COSMÉTICA, 2009).

Bastante comuns em xampus e máscaras de hidratação, os ácidos graxos essenciais são usados principalmente nos cosméticos de uso tópico. Por terem efeito antiqueratinizante, são muito usados para tratar peles e cabelos secos, deixando-os mais macios. Além disso, alguns óleos têm sido utilizados para auxiliar na fotoproteção e na minimização dos danos da radiação UV na pele. Para isso eles precisam ser moderadamente resistentes à oxidação e rancificação a fim de garantirem um produto estável durante todo o período de validade. Outra opção são os óleos encapsulados que apresentam menor contato com o oxigênio presente no ar, sendo menos suscetíveis à oxidação (STOLZ & OBERMAYER, 2005; COSMÉTICA, 2009).

Os ácidos graxos presentes em extrato de *Chlorella vulgaris* (Dermochlorella®, Codif, St. Malo, França) têm sido utilizados em cremes que visam estimular a regeneração de tecidos e a síntese de colágeno, o que resulta na redução de rugas. Recentemente dois novos produtos foram lançados, sendo um composto por extrato de *Nannochloropsis oculata* (Pepha-Tight®) caracterizado por proporcionar firmeza a pele com efeitos a curto e longo prazo, e outro com extrato de *Dunaliella salina* (Pepha-Ctive®) que demonstra capacidade de estimular a proliferação celular e influenciar o metabolismo energético envolvido na síntese da pele (SPOLAORE *et al*., 2006).

Os lipídios de microalgas apresentam ainda potencialidade na indústria petro-química, devido à possibilidade de se utilizar os ácidos graxos para produção de biodiesel. A atual produção comercial de biodiesel envolve uma transesterificação alcalina de TAGs encontrados em culturas de oleaginosas. No entanto, o cultivo de algumas oleaginosas para biodiesel não tem se tornado sustentável, uma vez que, são necessárias grandes quantidades de terra arável, bem como de água doce. Nesse sentido, as microalgas têm sido estudadas como promissoras fontes de TAGs para produção de biodiesel, apresentando como vantagens em relação ao cultivo de oleaginosas (BRENNAN & OWENDE, 2010):

(1) elevada produtividade resultante de maiores taxas de fotossíntese;

(2) podem ser cultivadas em terras não aráveis;

(3) não deslocam culturas tradicionais de oleaginosas voltadas para fins alimentícios;

(4) podem utilizar água do mar e água salobra, o que reduz o uso de água potável. Os nutrientes utilizados no cultivo, como nitrogênio e fósforo, também podem ser obtidos a partir de águas residuais. Além de fornecer meio de crescimento existe um potencial para tratamento de efluentes orgânicos provenientes da indústria;

(5) coleta pode ser diária sem seguir regime de safra;

(6) realizam a biofixação de CO_2 (1 kg de biomassa seca de microalga utiliza cerca de 1,83 kg de CO_2);

(7) o cultivo de algas não necessita de herbicidas ou pesticidas;

(8) podem produzir valiosos co-produtos, tais como proteínas, pigmentos, além da biomassa residual à extração de óleo que pode ser utilizada como fertilizante;

(9) teor e a qualidade dos ácidos graxos podem ser facilmente manipulados no sentido de se gerar um combustível que se enquadre na especificação a ser seguida.

Devido à maior eficiência fotossintética (entre 4 a 7%), a produtividade em biomassa e em óleo das microalgas é maior quando comparada às oleaginosas. Enquanto a produtividade em óleo de microalgas pode ser cerca de trinta vezes maior que a de palma (maior produtividade dentre as oleaginosas), a produtividade em biomassa pode ser cerca de dezenove vezes superior que a de soja (principal matéria-prima utilizada para produção de biodiesel) (COUTINHO & BOMTEMPO, 2011; FRANCO *et al*., 2012).

Contudo, a produção de biodiesel a partir de microalgas é um processo que para ser viável, necessita de intensa pesquisa científica, envolvendo avaliações que vão desde a verificação das espécies responsáveis pelas maiores produtividades gerais em ácidos graxos, até o estudo do uso dos co-produtos resultantes do processo de produção do biocombustível. Igualmente importantes são as questões relacionadas aos processos de separação da biomassa e extração do lipídio, bem como a produtividade em biomassa. Essas questões podem ser a chave para a viabilização econômica dos cultivos de microalgas visando à produção de biodiesel.

2.2.4 - Espécie *Chlorella vulgaris*

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB), a espécie *Chlorella vulgaris* está inserida na categoria de algas verdes a ser definida pelo filo *Chlorophyta*, classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales*, família *Oocystaceae* e gênero *Chlorella*. Gêneros do filo *Chlorophyta*, são em maioria unicelulares, predominantemente dulcícolas, apresentam o amido como principal fonte de reserva e a celulose como principal constituinte da parede celular (BICUDO & MENEZES, 2006).

Células da espécie *Chlorella vulgaris* (figura 4) possuem coloração verde devido à presença dos pigmentos clorofila *a* e *b* em seu cloroplasto. Além da clorofila, apresentam ainda β-caroteno e várias xantofilas como a luteína, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina, neoxantina, astaxantina e cantaxantina. Em relação ao metabolismo, essas células são capazes de suplementar a quantidade de carbono pela utilização de matéria orgânica dissolvida na forma de açúcares, ácidos aminados e outras moléculas pequenas, caracterizando um metabolismo mixotrófico (LOURENÇO, 2006).

Dentro do gênero *Chlorella*, diferentes espécies já foram descritas apresentando diferentes teores de lipídio, como é o caso de *Chlorella ellipsoidea*, com cerca de 4,5% em lipídios, *Chlorella pyrenoidosa*, com 2 a 12% em lipídios, *Chlorella protothecoides*, com aproximadamente 12% em lipídios e *Chlorella emersonii*, com 10 a 50% em lipídios (MATA, MARTINS & CAETANO, 2010). Para *Chlorella vulgaris*, uma das espécies mais estudadas devido à alta taxa de crescimento, fácil cultivo e difícil contaminação mesmo em sistemas abertos (HUNTLEY e REDALJE, 2006); já foi descrito um teor de 40% de lipídios em biomassa seca, quando Illman e colaboradores (2000) cultivam a espécie em baixa concentração de nitrogênio (203 $mg.L^{-1}$ de $(NH_4)_2HPO_4$), 25ºC, 25μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e sob aeração com ar enriquecido de CO_2 a 5,0% em uma vazão de $1L.min^{-1}$.

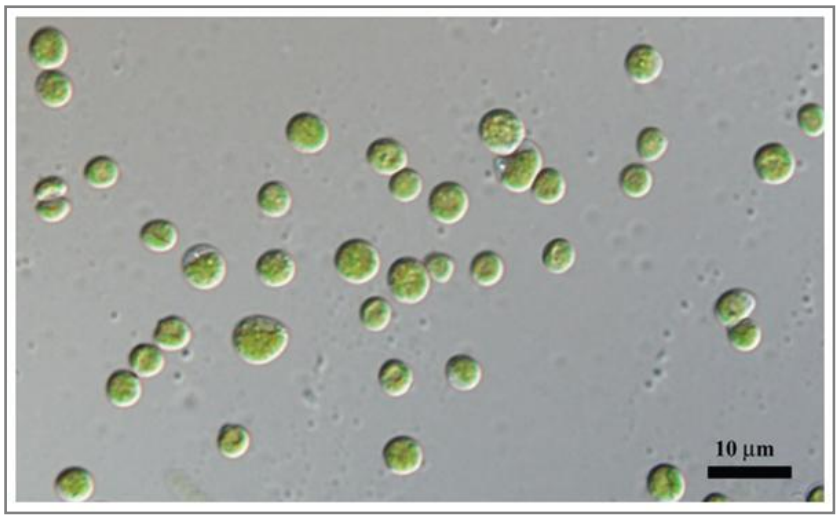


Figura 4. Observação microscópica de *Chlorella vulgaris*. Fonte: HELD & RAYMOND, 2011.

2.3 - Produção de biodiesel a partir de microalgas

De acordo com Halim e colaboradores (2012), a cadeia de produção de biodiesel utilizando com matéria-prima as microalgas envolve como principais etapas: cultivo de microalgas; separação da biomassa; extração; e transesterificação dos lipídios.

2.3.1 - Obtenção de biomassa (com elevador teor lipídico)

A escolha do método mais apropriado para o cultivo das microalgas é de suma importância para a viabilidade do processo, sendo importante a busca por um ponto ótimo entre o custo de implantação/operação e a produtividade em biomassa. De modo geral, a obtenção de biomassa pode ocorrer em cultivos abertos, em tanques tipo *raceway*, e cultivos fechados, em fotobiorreatores.

Tanques *raceway* são bastante utilizadas para o cultivo de microalgas por serem de baixo custo tanto de implantação como de operação. Em contrapartida necessitam de grande área de cultivo, a evaporação da água pode ser considerada significativa pelo contato direto com o ar, são mais propensos a oscilações de temperatura durante dia/noite e diferentes estações do ano, além de serem mais susceptíveis a contaminações com microrganismos indesejáveis (STEPHENSON *et al*., 2010).

Os fotobiorreatores fechados podem apresentar diferentes configurações geométricas e modos de operação, sendo os fotobiorreatores em forma de sacos e tubulares

os que apresentam melhor relação custo/produtividade. Esse tipo de cultivo possibilita um melhor controle das variáveis que podem afetar a produtividade em biomassa, tais como pH, temperatura, agitação e concentração de CO_2. Outra vantagem é que os fotobiorreatores fechados evitam a incidência direta da luz no cultivo, o que ameniza a intensidade dos raios solares na cultura. Como limitação, os fotobiorreatores ocasionam superaquecimento, acumulação de O_2, rompimento celular por cisalhamento e maiores custos de produção e operação (HARVEY, MACKLEY & SELIGER, 2003).

A produtividade em biomassa microalgal e o acúmulo de lipídios nesta podem ser manipulados por mudanças nas condições de crescimento, sendo a resposta espécie-específica (CONVERTI *et al*., 2009). Dentre os fatores nutricionais e ambientais (tabela III) que podem alterar as condições de crescimento destacam-se: os nutrientes; pH; intensidade de luz; temperatura; e aeração. Desse modo estudos que apresentam como estratégias de cultivo alterações no metabolismo de microalgas apresentam um potencial para aumentar a produtividade em biomassa e em lipídios, além de alterar o perfil dos óleos produzidos.

Tabela III. Efeito de diferentes condições de cultivo no perfil lipídico de microalgas. Fonte: BEHRENS & KYLE, 1996.

Condições de cultivo	Efeito no conteúdo e perfil lipídico
Baixa concentração de Nitrogênio	Aumenta o conteúdo lipídico
Baixa concentração de Fósforo	Aumenta o conteúdo lipídico
Íon Manganês	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta intensidade luminosa	Aumenta a quantidade de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Alta concentração de CO_2	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados

Algumas estratégias de cultivo para obtenção de biomassa têm sido estudadas como o desenvolvimento do metabolismo mixotrófico, ou ainda o cultivo em duas fases, sendo uma autotrófica e outra mixotrófica. O metabolismo mixotrófico é mais rápido e consequentemente apresenta maior produtividade quando comparado ao desenvolvimento autotrófico. Espécies de microalgas mixotróficas foram utilizadas com sucesso em escala

industrial para a produção de PUFAs, sendo o custo elevado do carbono orgânico um fator limitante para o uso destas espécies (ZHENG *et al*., 2012)

Em 2009, Liang, Sarkany & Cui compararam a produtividade em biomassa e lipídios para *Chlorella vulgaris* quando cultivada em condições autotrófica, heterotrófica e mixotrófica. Em condição autotrófica, as células foram cultivadas na presença (0,25g.L^{-1} de $NaNO_3$ no meio de cultura) e ausência de nitrato de sódio. Para cultivo heterotrófico, as células cresceram no escuro com presença de 1% de glicose. E finalmente, no cultivo mixotrófico, as células foram cultivadas na presença de luz com 1% de glicose. Os autores compararam ainda o uso de três fontes de carbono diferentes: glicose 1%; acetato 1% e glicerol a 1% e 2%. No caso do cultivo mixotrófico com 1% de acetato foi observado também a influência de nitrato de sódio. Dentre todos os cultivos testados, a máxima produtividade em biomassa (254mg.L^{-1}.d^{-1}) foi obtida em cultivo mixotrófico (presença de luz e 1% de glicose). Embora o maior conteúdo lipídico (38% em peso seco) tenha sido obtido em cultivo autotrófico com $NaNO_3$ no meio de cultura, o cultivo mixotrófico apresentou maior crescimento celular de modo a superar a produtividade em lipídios (54mg.L^{-1}.d^{-1}) quando comparado ao cultivo autotrófico.

Depois do carbono, o nitrogênio é o nutriente mais importante para a produção de biomassa. De modo geral a composição de macromoléculas em microalgas, na fase exponencial de crescimento e no crescimento em batelada, respeita a seguinte ordem: proteínas > carboidratos = lipídios > ácido nucléico (TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003). Contudo, em condições de estresse nutricional e envelhecimento da cultura essa proporção pode ser alterada com o aumento de lipídios e redução na concentração de proteínas. Respostas típicas à limitação de nitrogênio são a descoloração da célula (diminuição das clorofilas) e o acúmulo de carbono orgânico na forma de polissacarídeos e lipídios (BECKER, 1994).

Como já citado anteriormente, pesquisas que visam aumentar o conteúdo lipídico a partir de condições limitantes de nitrogênio, devem ser conduzidas de forma a não reduzir a produtividade em biomassa. Em algumas espécies de microalgas, por exemplo, a enzima *RubisCO* pode ser utilizada como uma fonte alternativa de nitrogênio. Essa degradação de proteínas contribui para menores taxas de fotossíntese e taxas de crescimento mais lentas (COURCHESNE *et al*., 2009).

Além do nitrogênio, outros constituintes vêm sendo estudados como a concentração de fósforo (LI *et al*., 2011; YIN-HU *et al*., 2012) e ferro (LIU, WANG & ZHOU, 2008; LIN, GU & JUNDA, 2012) no meio extracelular. Em alguns casos, esses constituintes são estudados por meio do planejamento experimental (LI *et al*., 2011), com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis simultaneamente. A metodologia do planejamento experimental é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

2.3.1.2 - Parâmetros de avaliação dos cultivos

A avaliação dos cultivos pode ser feita através de alguns parâmetros matemáticos, sendo os mais comuns, taxa específica de crescimento, produtividade em biomassa e produtividade em lipídios. Enquanto o primeiro parâmetro mede a variação do número de células por unidade de tempo específico, os dois últimos medem a obtenção do produto de interesse por unidade de tempo total, seja esse produto as células (biomassa) ou os lipídios. No caso de avaliação da potencialidade da biomassa visando à produção de biodiesel é interessante também avaliar a produtividade em TAGs e/ou proceder uma transesterificação direta na biomassa.

Na fase na qual o cultivo de microalgas apresenta crescimento exponencial, os incrementos populacionais num intervalo de tempo são profundamente influenciados pela densidade inicial de células, conforme representado pela equação:

$$rN = \left(\frac{dN}{dt}\right), \text{ onde}$$

d é a densidade de células, *N* é o número de células contadas, *t* é o tempo e *r* representa a taxa de crescimento exponencial da população ou constante de crescimento. Essa expressão pode ser derivada para:

$$N_f = N_i \times e^r \text{ , onde}$$

N_i é equivalente ao número de células no início do intervalo de tempo, N_f corresponde ao número de células no final do intervalo de tempo e *r* é a taxa proporcional de mudança. Esta última variável, portanto, é um componente chave para estabelecer a extensão da mudança numérica a partir de um dado ponto. Ela fornece uma expressão instantânea de

crescimento a partir da densidade de células. Por isso *r* é chamada de taxa instantânea de crescimento ou taxa intrínseca de aumento, sendo sua unidade expressa em d^{-1} ou h^{-1}. O desenvolvimento da expressão anterior origina a equação:

$$r = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{\Delta t} \text{, onde}$$

Δt é o intervalo de tempo decorrido entre as medidas de números de células e *ln* é o logaritmo natural dos valores. Assim *r* é geralmente tratado na literatura como a taxa de crescimento de culturas de microalgas e descrito como:

$$r = \mu - m \text{, onde}$$

μ é a taxa específica de crescimento e *m* a taxa de mortalidade da população. Se *m* for nulo, então a taxa específica instantânea de crescimento é igual à taxa específica de crescimento. Como em culturas de microalgas que crescem vegetativamente é difícil estimar *m*, muitas vezes assume-se que r e μ são iguais, quando na verdade essa condição é muito rara e, conceitualmente, essas duas variáveis são diferentes (LOURENÇO, 2006).

2.3.2 - Separação da biomassa

Após obtenção da biomassa, o passo seguinte é a separação as células do meio líquido, recuperando a biomassa para os processos *downstream*. O processo de separação dessa biomassa representa uma tarefa desafiadora devido ao tamanho desses microrganismos (geralmente 1 a 20 μm), além do fato de estarem suspensos em meio líquido (YEN CHEN *et al*., 2011).

A etapa de separação da biomassa é de grande importância para viabilidade do processo de obtenção do biodiesel, já que representa um total de 30 a 40% do custo da produção de biomassa. Estudos já demonstraram que a separação, junto à etapa de secagem da biomassa, representa um gasto significativo de energia na produção de biodiesel a partir de microalgas (SANDER & MURTHY, 2010).

Os principais métodos de colheita de biomassa são floculação, flotação, centrifugação e filtração. Processos como floculação e flotação estão envolvidos na etapa inicial de pré-separação, na qual ocorre a redução do volume de meio de cultura e aumento da concentração de biomassa. Após essa etapa inicial, o meio resultante é ainda mais concentrado através de técnicas como centrifugação e filtração. A escolha desses métodos depende das características da espécie de microalga a ser colhida como densidade, tamanho

celular e valor do produto desejado, levando em conta a energia requerida e rapidez que cada método apresenta (BRENNAN & OWENDE, 2010).

2.3.3 - Extração de lipídios

Embora todas as etapas citadas anteriormente sejam essenciais, a extração de lipídios (realizada com solvente devido à solubilidade dos lipídios) é particularmente importante devido à necessidade da lise celular para extravasamento do conteúdo lipídico que se encontra localizado no interior da célula. Sendo assim a escolha do método mais apropriado para cada microalga estudada é de fundamental importância para aumentar a eficiência da extração lipídica (YON LEE *et al*., 2010).

O solvente utilizado para extração deve atender a alguns requisitos como: possuir seletividade para separar o óleo de materiais estranhos ou indesejáveis; baixa toxicidade; fácil recuperação sem deixar resíduos no óleo; imiscibilidade em água; e apresentar ponto de ebulição que favoreça a sua posterior eliminação. Solventes como hexano, metanol, etanol e misturas de clorofórmio:metanol são comumente utilizados para extração lipídica em microalgas (KING, LIANG & RUSCH, 2002).

Vários métodos de rompimento celular podem ser utilizados para ruptura da parede celular a depender da composição da parede e da natureza dos produtos de interesse. Dentre esses métodos incluem-se os processos mecânicos tais como moinhos (homogeneizador *potter*, por exemplo), ultrassom; e os métodos não mecânicos como choque osmótico, congelamento, autoclave, micro-ondas e digestão enzimática. Os métodos não mecânicos muitas vezes podem desnaturar as enzimas e proteínas presentes nas células (FON SING *et al*., 2010).

Muitos são os trabalhos que têm demonstrando o uso de diferentes solventes orgânicos associados a diferentes métodos de rompimento celular. Em 2010, Yon Lee e colaboradores, observaram o efeito de diferentes métodos de rompimento celular na extração lipídica das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Botryococcus* sp. Os autores conduziram a extração na presença da mistura clorofórmio:metanol (1:1) associado ao uso de autoclave, triturador, micro-ondas, sonicador, e solução NaCl 10%. Para as três espécies estudadas, o maior produtividade em lipídios foi obtida na extração associada ao uso do micro-ondas com resultados de 7,4mg.L^{-1}.d^{-1} (*C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp.) e 10,2mg.L^{-1}.d^{-1} (*Botryococcus* sp.).

Sheng e colaboradores (2011) também investigaram diferentes métodos de lise celular no processo de extração lipídica de *Chlorella vulgaris* com clorofórmio:metanol (1:1). Foram testados, moagem com areia molhada, moagem com areia úmida, moagem com nitrogênio líquido, ultrassom, triturador, lise enzimática e micro-ondas; sendo as maiores concentrações lipídicas obtidas nos processos de moagem com nitrogênio líquido (29% em peso seco), lise celular com celulase (24%), lise celular com lisozima (22%), micro-ondas (18%) e ultrassom (15%).

Muitos estudos têm demonstrado extração de lipídios através do método por fluído supercrítico. Esse método tem como princípio básico alcançar uma determinada fase que está além da fase crítica (supercrítica), em qual o menisco de separação das fases líquida e gasosa desaparece restando uma fase homogênea (SAWANGKEAW, BUNYAKIAT & NGAMPRASERTSITH, 2010). Vários fluídos supercríticos estão sendo explorados como CO_2, etanol, metanol, etileno, benzeno e tolueno (MENDES *et al*., 2003).

Particularmente, a extração com fluído supercrítico de CO_2 ($SCCO_2$) tem sido bastante interessante para extração de produtos relacionados às microalgas devido às vantagens como: não apresenta toxicidade; a baixa temperatura do processo (31ºC) impede a degradação térmica de produtos; a alta difusão e baixa tensão superficial permitem o acesso a poros menores nas células; além da fácil separação de CO_2 em temperatura ambiente. No entanto, as principais desvantagens do uso supercrítico de CO_2 são os elevados custos de operação e as questões relacionadas à segurança (JAIME *et al*., 2007; MENDES *et al*., 2003; OTA *et al*., 2009).

Em 2011, Halim e colaboradores compararam o rendimento da extração de lipídios totais utilizando hexano associado ao uso de *soxhlet* em relação à extração $SCCO_2$. No estudo, os autores utilizaram a microalga *Chlorococcum* sp. sendo as condições da extração $SCCO_2$ de: 60ºC e 30MPa. Ao utilizar hexano e *soxhlet*, em cinco horas de extração, foram obtidos cerca de 0,03g de lipídios por grama de biomassa seca. Já na extração $SCCO_2$, em uma hora de extração, foram obtidos cerca de 0,06g de lipídios por grama de biomassa seca.

2.3.4 - Transesterificação de lipídios

Assim como nas oleaginosas, para que o óleo de microalgas seja compatível com os motores a diesel, esse óleo necessita passar por um processo químico denominado

transesterificação. Como já descrito anteriormente, no processo de transesterificação as moléculas de TAGs presentes no óleo de microalgas reagem com um álcool (metanol, por exemplo) geralmente na presença de um catalisador de modo a formar ésteres (nesse caso metílicos) de ácidos graxos. Estequiometricamente, para cada três moléculas de álcool e uma molécula de TAG são produzidos três ésteres e uma molécula de glicerina.

Além das rotas convencionais de produção de biodiesel (extração de lipídios seguida da transesterificação), alguns trabalhos têm demonstrado a reação de transesterificação *in situ*. Nesse caso a extração e transesterificação ocorrem no mesmo processo com o álcool atuando em dois papeis, o de solvente para extração e de reagente para transesterificação (LAM & LEE, 2012). A transesterificação *in situ* apresenta maiores rendimentos em ésteres quando comparada à rota convencional, além de reduzir o tempo de processamento e consequentemente o custo de produção. Para *Chlorella vulgaris* já foi descrito um rendimento de 90% em ésteres metílicos quando realizado transesterificação *in situ* nas seguintes condições: temperatura de reação de 60ºC; metanol como solvente; ácido sulfúrico como catalisador (0,04 mol) e tempo de reação de 4h (EHIMEN, SUN & CARRINGTON, 2010).

2.4 - Justificativa

A existência de grandes quantidades de ácidos graxos em algumas microalgas, aliada às várias vantagens em relação às outras fontes tradicionais de ácidos graxos, tem estimulado o desenvolvimento de projetos com estratégias para viabilizar economicamente a síntese de lipídios em microalgas. No Brasil, o cultivo em massa de microalgas é um campo de investigação bastante promissor. Considerando a existência de regiões com condições climáticas potencialmente adequadas, com temperaturas amenas e sol em abundância, sua prática parece ser uma possibilidade sócio-econômica muito promissora em praticamente todas as regiões do país.

No entanto, para que as microalgas possam ser efetivamente utilizadas para a produção de diversos óleos a serem aplicados no setor energético, é necessária intensa pesquisa científica envolvendo avaliações que vão desde a verificação das espécies que apresentam maiores produtividades gerais em óleos, até o estudo do uso dos co-produtos resultantes do processo de produção do biocombustível. Nesse contexto, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas que visam aumentar a produtividade em biomassa e em óleos a fim de diminuir os custos envolvidos e difundir o uso dessa biomassa.

Dada a importância do tema, vários projetos de produção de biodiesel a partir de microalgas estão em andamento em vários países, como EUA, China e Austrália. No Brasil, as pesquisas sobre o uso de microalgas para a produção de biodiesel ainda são bastante recentes e em pequeno número. Considerando a grande política de incentivo à produção de biodiesel no país, é urgente e justificada a reunião de esforços pela comunidade científica para viabilizar as microalgas como nova fonte de óleos graxos.

3 - OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar diferentes condições de cultivo de *Chlorella vulgaris* visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios.

Objetivos específicos

- Seleção do método de extração lipídica mais eficiente, para biomassa de *Chlorella vulgaris*, a ser utilizado nas etapas de avaliação de diferentes condições de cultivo e aplicação de condição de estresse no meio de cultura.

- Avaliação, por meio do planejamento experimental, de diferentes condições de cultivo visando à maximização da produção de biomassa.

- Aplicação de condição de estresse no meio de cultura visando aumentar o teor lipídico na biomassa.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

As principais etapas realizadas nesse trabalho estão apresentadas no quadro IV.

Seleção do método de extração lipídica mais eficiente, para biomassa de microalgas, a ser utilizado nas etapas seguintes.

Análise comparativa entre diferentes protocolos de extração de lipídios, tendo em vista à quantificação de lipídios totais e triacilglicerídeos, bem como o perfil de ácidos graxos. Os protocolos utilizados se diferenciaram quanto ao tipo de solvente e mecanismo de rompimento celular aplicado.

↓

Avaliação, por meio do planejamento experimental, de diferentes condições de cultivo visando à maximização da produção de biomassa.

Inicialmente foram estudadas como variáveis independentes a concentração de nitrato e a concentração de fosfato, enquanto a variável dependente observada foi a produtividade em biomassa.

→

Os resultados do 1º planejamento direcionaram para um 2º estudo tendo como variáveis independentes a concentração de nitrato e o inóculo inicial de células.

↓

Aplicação de condição de estresse no meio de cultura visando aumentar o teor lipídico na biomassa.

Biomassa crescida e coletada na melhor condição de cultivo indicada no planejamento foi estressada, via ausência de nitrato, e avaliada quanto ao seu teor lipídico.

Quadro IV. Fluxograma da metodologia utilizada.

4.1 - Microrganismo e manutenção

Foi utilizada a microalga dulcícola *Chlorella vulgaris*, gentilmente cedida pelo Prof. Armando A. H. Vieira da Universidade Federal de São Carlos. A cepa foi mantida em tubos contendo 8mL de meio WC modificado estéril (GUILLARD & LORENZEN, 1972 - em anexo) para cada 2 gotas da cultura retirada com pipeta pasteur estéril. Os tubos foram mantidos em câmara de germinação, sob 20μmol de fótons.$m^{-2}s^{1}$, 21±1°C, sendo agitados manualmente a cada 48h e as células repicadas a cada 20 dias.

4.2 - Obtenção de biomassa

4.2.1 - Seleção do método de extração lipídica mais eficiente

Para obtenção do inóculo, as células foram cultivadas em frascos erlenmeyer estéreis de 500mL contendo 300mL de meio WC modificado estéril. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 180rpm, 100μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e 25±2°C, sendo a cultura crescida até alcançar uma densidade óptica em 730nm (DO_{730nm}) em torno de 0,8 (fase exponencial). O inóculo obtido foi transferido (de modo que a concentração final de células no meio de cultura fosse DO_{730nm} 0,02) para garrafas do tipo pet cristal de 6L contendo 5L de meio WC modificado estéril (figura 5). As culturas em batelada simples foram mantidas sob agitação pneumática, intensidade de luz de 100μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e temperatura de 25±2°C até alcançar um DO_{730nm} em torno de 1,0 (fase estacionária). A biomassa obtida foi coletada por centrifugação a 3.500rpm (ou 2607g) durante 10min, sendo em seguida liofilizada e estocada a 4°C até o momento das extrações.

Figura 5. Biomassa de *C. vulgaris* obtida em garrafas do tipo pet de cristal.

4.2.2 - Avaliação, por meio do planejamento experimental, de diferentes condições de cultivo visando à maximização da produção de biomassa.

Inicialmente, foram estudadas como variáveis independentes do planejamento experimental as concentrações de nitrato de sódio e fosfato de potássio dibásico do meio de cultura. As variáveis foram estudadas por meio de uma análise fatorial do tipo 2^2 com três pontos centrais (tabela IV), resultando em um total de sete ensaios (tabela V). O inóculo obtido (conforme descrito anteriormente) foi lavado com o meio a ser cultivado para garantir que não estivesse carregando nitrato e fosfato do meio anterior e transferido (de modo que a concentração final de células fosse DO_{730nm} 0,02) para garrafas do tipo pet cristal de 6L contendo 5L de meio correspondente, conforme a tabela V. As culturas foram mantidas sob agitação pneumática, 100μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e 25±2°C até alcançar um DO_{730nm} em torno de 1,0. A variável dependente (produtividade em biomassa) foi avaliada através de registros diários do peso seco. A taxa de crescimento foi determinada por observações diárias do DO_{730nm} e a análise estatística dos resultados feita com auxílio do programa DESIGN-EXPERT versão 8.0.7.1 trial.

Tabela IV. Tabela de níveis da análise fatorial nitrato x fosfato.

Variáveis Independentes	-1	0	+1
$NaNO_3$ (mg.L^{-1}) - X_1	30,35	75,29	120,0
K_2HPO_4 (mg.L^{-1}) - X_2	4,49	8,72	13,46

Tabela V. Matriz de níveis para análise fatorial 2^2 com três pontos centrais.

Ensaios	X_1	X_2
Garrafão 1	-1	-1
Garrafão 2	+1	-1
Garrafão 3	-1	+1
Garrafão 4	+1	+1
Garrafão 5	0	0
Garrafão 6	0	0
Garrafão 7	0	0

Os resultados iniciais direcionaram os estudos para o desenvolvimento de um novo planejamento experimental alterando a faixa de estudo da concentração de nitrato de sódio e inserindo como variável independente o inóculo inicial de células. A concentração de fosfato de potássio bibásico foi fixada em 4,49mg.L^{-1}. Novamente as variáveis foram estudadas por meio de uma análise fatorial do tipo 2^2 com três pontos centrais (tabela VI), resultando em sete ensaios (tabela V). O inóculo obtido foi lavado (já descrito anteriormente) e transferido para garrafas do tipo pet cristal de 6L contendo 5L de meio, conforme a tabela V. As culturas foram mantidas sob agitação pneumática, 100μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e 25±2°C até alcançar um DO_{730nm} em torno de 1,0. Durante o segundo desenho experimental, as garrafas foram mantidas sob sistema de rodízio de posição na estante (a cada 24 horas) para garantir que todas as culturas estivessem sob as mesmas intensidades de luz. A produtividade em biomassa foi determinada por observação diária do peso seco. A taxa de crescimento foi calculada através de observações diárias do DO_{730nm}. Os resultados foram avaliados através do programa DESIGN-EXPERT versão 8.0.7.1 trial. Para validação dos resultados obtidos no planejamento, as melhores condições de cultivo foram repetidas e a produtividade em biomassa determinada ao final do cultivo.

Tabela VI. Tabela de níveis da análise fatorial nitrato x inóculo inicial de células**.**

Variáveis Independentes	-1	0	+1
$NaNO_3$ (g.L-1)- X_1	0,12	0,67	1,21
Inóculo inicial de células (DO_{730nm}) - X_2	0,02	0,11	0,20

4.2.3 - Aplicação de condição de estresse no meio de cultivo visando aumentar o teor lipídico na biomassa

Parte da biomassa crescida na melhor condição de cultivo, conforme indicado no planejamento, foi coletada por centrifugação a 3.500rpm (ou 2607g) durante 10min e liofilizada para análise de seu conteúdo lipídico. Outra parte foi centrifugada, lavada e ressuspendida em meio WC modificado estéril contendo 4,49mg.L^{-1} de fosfato de potássio dibásico e isento de nitrato de sódio, o qual foi determinado de “meio de estresse”. Esta cultura foi crescida em garrafa do tipo pet cristal de 6L contendo 5L de meio WC, sendo

mantida sob agitação pneumática, 100µmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e 25±2°C por mais 4 dias. Após esse período, a biomassa "estressada" foi também coletada por centrifugação sendo em seguida liofilizada e avaliada quanto às mudanças em seu conteúdo lipídico. A produtividade em biomassa ao final de cada etapa de cultivo foi obtida através da quantificação do peso seco.

4.2.4 - Parâmetros do cultivo: taxa específica de crescimento e produtividade em biomassa

A taxa específica de crescimento (µ) da cultura foi avaliada na fase exponencial de crescimento por meio de curvas de crescimento, obtidas por verificação diária do DO_{730nm}, sendo calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$\mu = \left(\frac{1}{t}\right)\ln\left(\frac{X_f}{X_i}\right), \text{ onde}$$

t é o tempo total (dias) de crescimento celular, X_f é a concentração final da cultura e X_i é a concentração inicial. O resultado foi expresso em d^{-1}.

O peso seco foi obtido filtrando-se, a vácuo, volumes conhecidos da cultura em membrana de fibra de vidro 0,45µm, previamente pesada. Após a filtração, a membrana foi seca em estufa a 105ºC em pernoite, sendo na sequência pesada novamente. O peso da biomassa seca foi calculado a partir da subtração entre o peso final e o peso inicial da membrana conforme fórmula a seguir:

$$Peso\ seco = \frac{(M_f - M_i)\times 1000}{v}, \text{ onde}$$

M_f é o peso final da membrana (g), M_i é o peso inicial da membrana (g) e v é o volume de cultura filtrado (mL). O resultado foi expresso em $g.L^{-1}$.

A produtividade (P_b) em biomassa foi calculada segundo a fórmula a seguir:

$$P_b = \frac{B_f - B_i}{t}, \text{ onde}$$

B_f é a biomassa seca final obtida após o tempo total de cultivo ($g.L^{-1}$), B_i é a biomassa seca inicial obtida no tempo zero de cultivo ($g.L^{-1}$) e t é o tempo total (dias) para obtenção da biomassa. O resultado foi expresso em $g.L^{-1}.d^{-1}$.

4.3 - Extração de lipídios totais

Foram testados diferentes protocolos de extração envolvendo os seguintes solventes: etanol (MONTES D'OCA et al., 2011), hexano (MONTES D'OCA et al., 2011), clorofórmio:metanol 1:2 (BLIGH & DYER, 1959) e clorofórmio:metanol 2:1 (FOLCH, LESS & SLOANE STANLEY, 1957). No procedimento segundo Montes D'Oca, foram utilizados 0,5g de biomassa seca para cada 20mL de etanol ou hexano (a depender do protocolo), sendo a mistura submetida ao ultrassom por 20min em temperatura ambiente de 25°C. Na sequência, a biomassa foi separada por centrifugação a 2.000rpm (ou 1490g) durante 5min. A fase orgânica foi cuidadosamente transferida para balão de rotavaporador e evaporada em rotavaporador rotatório a 60°C. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa com circulação de ar a 30°C.

No método segundo Bligh & Dyer, foi necessário adicionar 2mL de água destilada para cada 0,5g de biomassa seca. À biomassa úmida foram adicionados 7,5mL de solução clorofórmio:metanol 1:2 seguido da agitação manual por 2min. Em seguida foram adicionados 2,5mL de clorofórmio, sendo feita agitação manual por 30s, e mais 2,5mL de água destilada, e novamente, feita agitação manual por 30s. A biomassa foi separada por centrifugação a 3.500rpm (ou 2607g) durante 8min a 4°C. A fase orgânica foi cuidadosamente transferida para balão de rotavaporador e evaporada em rotavaporador a 50°C. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa com circulação de ar a 30°C.

No último protocolo de extração a ser testado, "Folch", foram utilizados 36mL de solução clorofórmio:metanol 2:1 para cada 0,5g de biomassa seca, sendo a mistura submetida a trituração em *potter* (velocidade média) por 3min. A biomassa foi separada por centrifugação a 3.500rpm (ou 2607g) durante 8min a 4°C. A fase orgânica foi cuidadosamente recolhida, sendo transferida para outro tubo onde sofreu a adição de 9mL de KCl 0,88%. Nesse momento foram formadas duas fases, sendo a parte superior desprezada com o auxílio de uma pipeta. À parte inferior foram adicionados 4,5mL de solução clorofórmio:metanol:água 3:48:47. Novamente foi observado a formação de duas fases, sendo a parte superior desprezada com o auxílio de uma pipeta, e feita a lavagem com a solução clorofórmio:metanol:água por mais duas vezes. A orgânica final foi cuidadosamente transferida para balão de rotavaporador e evaporada em rotavaporador 40°C. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa com circulação de ar a 30°C.

Uma vez realizados os quatro protocolos em suas versões originais, foram realizadas algumas modificações na metodologia quanto ao rompimento celular. No caso do método de Bligh & Dyer, foram realizadas extrações utilizando também ultrassom e *potter*. Para a extração assistida pelo uso de ultrassom, todos os solventes foram adicionados e as etapas de agitação manual substituídas pelo uso do ultrassom por 20min a temperatura ambiente de 25°C. Já no uso do *potter*, foram mantidas as agitações sendo apenas realizadas com o auxílio do *potter*. Para o procedimento de "Folch", foram realizadas extrações utilizando o ultrassom. Nesse caso, o rompimento celular com *potter* foi substituído pelo uso de ultrassom por 20min em temperatura ambiente de 25°C. Todas as extrações foram realizadas em triplicatas e o rompimento celular feito com o auxílio do microscópio óptico. A massa de lipídios foi determinada por análise gravimétrica.

Tabela VII. Diferentes protocolos de extração testados**.**

Solvente	***Mecanismo de rompimento celular / Tempo de extração***	***Variações na metodologia***
Etanol (MONTES D'OCA *et al*., 2011)	Ultrassom / 20min	-
Hexano (MONTES D'OCA *et al*., 2011)	Ultrassom / 20min	-
Clorofórmio: metanol (1:2) (BLIGH & DYER, 1959)	Agitação manual / 3min	Ultrassom / 20min *Potter* / 3min
Clorofórmio: metanol (2:1) (FOLCH, LESS & SLOANE STANLEY, 1957)	*Potter* / 3min	Ultrassom / 20min

O teor de lipídios (%*LT*) foi calculado segundo a fórmula a seguir:

$$\%LT = \frac{(M_f - M_i) \times 100}{M_b}$$, onde

M_f é a massa final (g) do balão volumétrico onde foi realizada a evaporação do solvente, M_i é a massa inicial (g) do balão volumétrico e M_b (g) é a quantidade de biomassa utilizada para a extração de lipídios. A produtividade (P_{LT}) de lipídios foi calculada segundo a fórmula a seguir:

$$P_{LT} = \frac{LT}{t}, \text{ onde}$$

LT é a quantidade de lipídios totais obtido por volume de cultura ($mg.L^{-1}$) e t é o tempo total (dias) para obtenção dos lipídios. O resultado foi expresso em $mg.L^{-1}.d^{-1}$.

4.3.1 - Quantificação de triacilglicerídeos

A quantificação de triacilglicerídeos nas amostras de lipídios foi realizada pelo método glicerol-3-fosfato oxidase-p-clorofenol (triglicérides monoreagente K117; Bioclin) (TAKAGI, KARSENO & YOSHIDA, 2006). O lipídio presente no interior do balão de rotovaporador foi ressuspendido em 5mL de álcool isopropílico, sendo 10µL dessa amostra (lipídio + álcool) transferidos para um tubo onde foi adicionado 1mL do reagente enzimático. Para análise do padrão, foram utilizados 10µL do reagente padrão em 1mL do reagente enzimático. Como branco, foram utilizados apenas 10µL do reagente enzimático. Devidamente homogeneizados, os tubos foram submetidos a banho-maria por 10min. Após esse período, a absorbância foi lida em comprimento de onda de 500nm e o branco utilizado para zerar o equipamento. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

A quantidade de triacilglicerídeos (TAG) foi calculada segundo a fórmula a seguir:

$$TAG = \left(\frac{A_a \times V_a}{A_p} \right), \text{ onde}$$

A_a é a absorbância obtida da amostra, A_p é a absorbância obtida do padrão e V_a é o volume de álcool isopropílico utilizado para ressuspender o lipídio presente no interior do balão. O resultado obtido foi expresso em $mg.5mL^{-1}_{\text{álcool}}$.

Uma vez obtida a massa de TAG e sabendo a massa de LT ou a quantidade de biomassa que originou o TAG, é possível calcular a concentração de TAG (C_{TAG}) nos LT segundo a fórmula a seguir:

$$C_{TAG} = \frac{TAG}{LT}, \text{ onde}$$

TAG é a massa de triacilglicerídeos (mg) e *LT* é a massa de lipídios totais (g). O resultado foi obtido em $mg.g^{-1}{}_{lipídio}$. Por fim foi calculada a produtividade de triacilglicerídeos (P_{TAG}) de acordo com a fórmula a seguir:

$$P_{TAG} = \frac{C_{TAG}}{t}, \text{ onde}$$

C_{TAG} é a concentração triacilglicerídeos ($mg.g^{-1}{}_{lipídio}$) e *t* é o tempo total (dias) de cultivo para obtenção dos triacilglicerídeos. O resultado foi expresso em $mg.g^{-1}.d^{-1}$.

4.3.2 - Perfil de ácidos graxos

Para análise do perfil de ácidos graxos foi realizada a reação de transesterificação (segundo a norma ASTM D 3457 - 87) na amostra de lipídios totais, de modo a obter glicerol e ésteres de ácidos graxos. Em um balão volumétrico, foram adicionados 6mL de solução NaOH em metanol (0,5N) à 0,4g da amostra de óleo, sendo a mistura submetida ao banho-maria para dissolução do óleo (baixo aquecimento para não evaporar o solvente) por cerca de 1min. Na sequência foram adicionados 8mL de trifluoreto de boro em metanol (20% de metanol) sendo a amostra fervida por cerca de 2min. Após o esfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 2mL de hexano e solução saturada de NaCl (observando a subida da fase orgânica no gargalo do balão volumétrico) para recuperação dos ésteres. Uma vez resfriada, a amostra permaneceu em repouso até separação das camadas orgânica e aquosa. Para análise foram injetados 1μL na camada orgânica, a qual continha os ésteres.

A análise por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas foi feita em coluna HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária. Foi utilizada injeção no modo ‘split’ com razão de 10:1 para volume de injeção de 1 μL e na faixa de massas de 20 a 500u.m.a. A temperatura inicial do forno foi 40°C (1min), sendo feita variação a $10^{o}C.min^{-1}$ até 300ºC (30min). O injetor foi mantido a 250ºC e a interface a 300ºC. O gás hélio (H_2) foi utilizando como gás de arraste a uma vazão de $1mL.min^{-1}$. Os ácidos graxos foram identificados pela consulta à biblioteca digital de espetros de massas Willey7Nist05 e via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM).

4.4 - Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através o software BIOEST 5.0, sendo de 95% o nível de significância adotado (p <0,05).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Seleção do método de extração lipídica

Embora a extração de lipídios seja principalmente feita pelos métodos de “Bligh & Dyer” e “Folch”, diferentes procedimentos vêm sendo descritos em relação à concentração dos solventes clorofórmio e metanol, mecanismo de rompimento celular e tempo de extração. Baseado nos inúmeros relatos da literatura quanto à extração de lipídios da biomassa de microalgas, no fato da eficiência do método depender da espécie estudada e, no pequeno número de estudos que apresentam análises comparativas entre esses métodos; fez-se necessário selecionar o método de extração lipídica mais eficiente para a *C. vulgaris* utilizada no presente trabalho. Essa etapa não teve por objetivo validar uma ou outra metodologia para ser aplicada em larga escala, mas sim selecionar o método mais eficiente a ser utilizado no laboratório nas etapas de quantificação de lipídios totais.

Diferentes protocolos de extração foram comparados, tendo em vista a quantificação de lipídios totais e triacilglicerídeos. Os protocolos utilizados se diferenciaram quanto ao tipo de solvente e mecanismo de rompimento celular. Inicialmente foram avaliados os solventes etanol e hexano, clorofórmio:metanol (1:2) e clorofórmio:metanol (2:1), utilizando para rompimento celular o ultrassom por 20min, a agitação manual por 3min e o *potter* por 3min, respectivamente. Após as avaliações iniciais quanto aos solventes utilizados, a mistura clorofórmio:metanol (1:2) foi testada com ultrassom por 20min e *potter* por 3 min; já a mistura clorofórmio:metanol (2:1) foi testada com ultrassom por 20min. A figura 6 mostra a análise comparativa dos diferentes protocolos em relação ao teor de lipídios totais.

Numa análise, em relação aos solventes utilizados, o uso da mistura clorofórmio:metanol (2:1) se mostrou mais eficiente (extraindo 16% LT) em relação ao etanol (cerca de 10% LT), hexano (aproximadamente 4% LT) e clorofórmio:metanol (1:2) (6% LT). Em uma análise, quanto ao mecanismo de rompimento celular, foram observados diferentes comportamentos. Para a mistura clorofórmio:metanol (1:2), o uso do *potter* (extraindo cerca de 7% LT) foi mais eficiente quando comparado à agitação manual (6% LT) e ao uso do ultrassom (5% LT). Já no caso da mistura clorofórmio:metanol (2:1), o uso do ultrassom (aproximadamente 19 % LT) foi mais eficiente quando comparado ao uso do *potter* (16% LT).

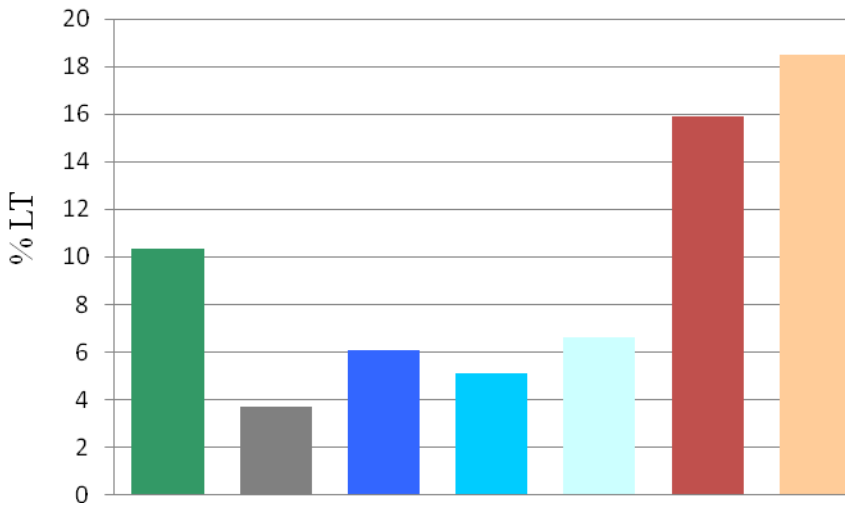


Figura 6. Análise comparativa de diferentes protocolos de extração em relação ao teor de lipídios totais. Etanol (■); hexano (■); Clorofórmio:metanol (1:2) com agitação manual (■); clorofórmio:metanol (1:2) com ultrassom (■); clorofórmio:metanol (1:2) com *potter* (■); clorofórmio:metanol (2:1) com *potter* (■) e clorofórmio:metanol (2:1) com ultrassom (■) (n=3).

O hexano e clorofórmio, solventes apolares, tendem a penetrar na membrana celular e extrair os lipídios neutros[8] presentes no citoplasma. Esses solventes se ligam aos lipídios por ligações *van der Waals* de modo a formar um complexo "solvente orgânico + lipídios neutros". Esse complexo, acionado por um gradiente de concentração, difunde através da membrana celular e da película estática de solvente[9]. Como resultado, os lipídios neutros são extraídos da célula e dissolvidos no solvente orgânico apolar (MERCER & AMENTA, 2011).

Alguns lipídios neutros são encontrados no citoplasma unidos com lipídios polares[10]. Esse complexo "lipídio neutro + lipídios polares" está ligado a proteínas através de ligações do tipo hidrogênio. Nesse caso, as interações *van der Waals* formadas pelos solventes apolares não são capazes de interromper essas associações entre lipídios e proteínas, sendo necessário o uso de solventes polares, tais como metanol e etanol. Os solventes polares

[8] Mais indicados para produção de biodiesel devido à quantidade de ácidos graxos, encontram-se em grande parte no interior da célula. Exemplos: TAGs e ceras.

[9] Formado pela interação entre os solventes e a parede celular.

[10] Lipídios que contêm outros componentes além dos ácidos graxos. Exemplos: fosfolipídios, glicolipídios, carotenoides e esteróis.

formam ligações do tipo hidrogênio com os lipídios polares, enquanto os solventes apolares se associam aos lipídios neutros (MERCER & AMENTA, 2011).

Misturas de clorofórmio:metanol são usadas para assegurar a extração completa de todos os lipídios neutros, tanto sob a forma de glóbulos livres como sob a forma de complexos associados à proteínas. Além disto, essas misturas extraem tanto lipídios neutros, através do clorofórmio, como lipídios polares, através do metanol. Por esse motivo, essas misturas tendem a apresentar maiores resultados de lipídios totais extraídos. De acordo com Molina e colaboradores (1999), misturas de clorofórmio:metanol extraem hidrocarbonetos, carotenoides, clorofilas, esteróis, triacilgliceróis, ceras, aldeídos, ácidos graxos, fosfolipídios e glicolipídios; enquanto o uso de hexano extrai preferencialmente hidrocarbonetos, triacilgliceróis e ácidos graxos.

A escolha dos solventes foi baseada em duas misturas de solventes apolares e polares comumente utilizadas (clorofórmio:metanol na proporção 1:2 e 2:1), um solvente apolar (hexano) e um solvente polar (etanol). Embora o uso do hexano possa parecer mais adequado, visto que a extração é em grande parte, exclusivamente, de TAGs (uma das matérias-prima para biodiesel); faz-se necessária a exata quantificação de TAGs para melhor seleção do método de extração.

A figura 7 mostra a análise comparativa dos diferentes protocolos em relação à concentração de TAGs. A concentração de TAGs em relação ao peso seco da biomassa mostrou ser relativamente proporcional ao teor de lipídios, logo o protocolo que apresentou maior teor de lipídios, clorofórmio:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom, também foi o protocolo que apresentou maior quantidade de TAGs por grama de biomassa. Apesar dos solventes polares auxiliarem a extração de fosfolipídios e glicolipídios, os quais também contêm ácidos graxos, é muito improvável que o kit enzimático tenha quantificando esses ácidos graxos como TAGs, isso porque o sítio ativo da enzima do kit liga-se à molécula de glicerol que está associada aos ácidos graxos do TAG. Logo a maior concentração de TAG alcançada pelo uso da mistura clorofórmio:metanol (2:1) pode ser explicada pelo fato dos solventes polares auxiliarem a extração de lipídios neutros (TAGs) tanto sob a forma livre como sob a forma de complexos, enquanto o solvente neutro (hexano) extrai preferencialmente moléculas de TAGs livres.

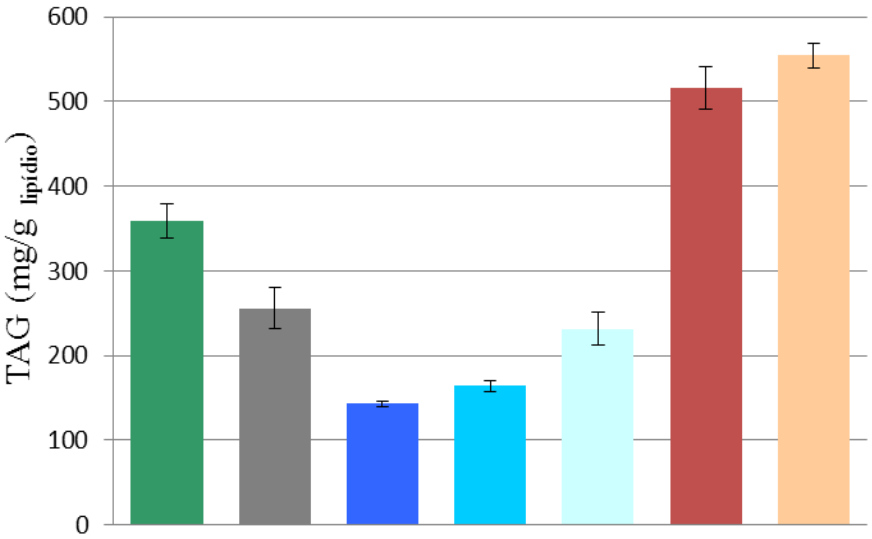


Figura 7. Análise comparativa de diferentes protocolos de extração em relação à concentração de TAGs. Etanol (■); hexano (■); Clorofórmio:metanol (1:2) com agitação manual (■); clorofórmio:metanol (1:2) com ultrassom (■); clorofórmio:metanol (1:2) com *potter* (■); clorofórmio:metanol (2:1) com *potter* (■) e clorofórmio:metanol (2:1) com ultrassom (■). As barras na vertical representam o desvio padrão (n=3).

Quanto ao mecanismo de rompimento celular, a associação de ultrassom ao uso de solventes orgânicos aumentou a quantidade de lipídios extraídos da biomassa de microalgas. A figura 8 ilustra as consequências dos solventes e do ultrassom sobre a parede celular de *C. vulgaris*.

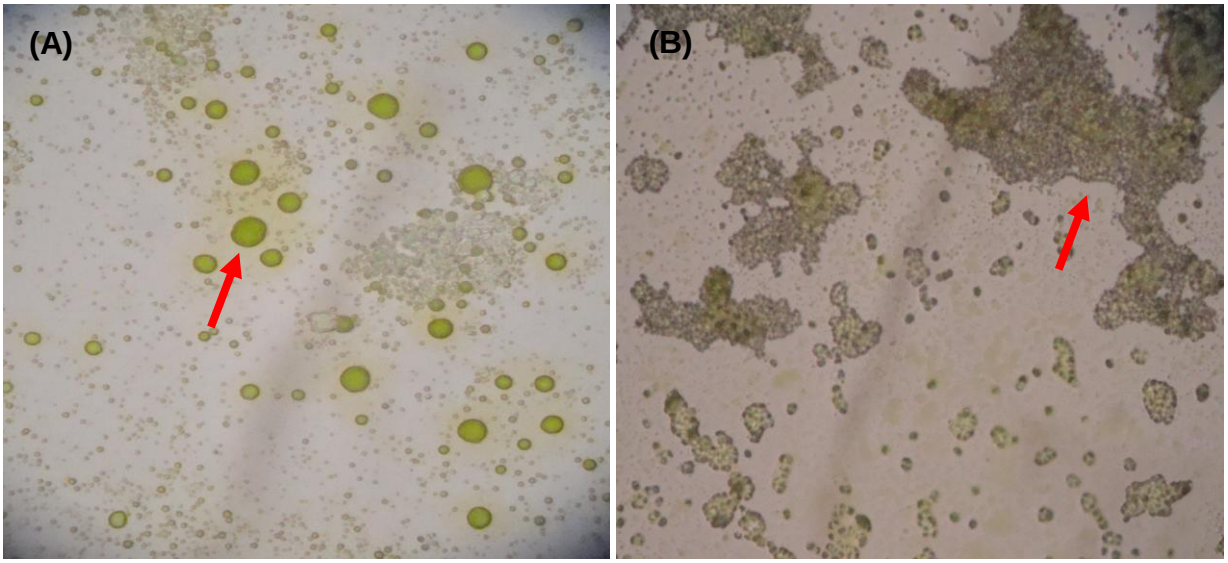


Figura 8. Célula de *C. vulgaris* em diferentes fases de extração. (A) Controle - células antes de serem submetidas à extração. Seta vermelha aponta a célula íntegra. (B) Detritos celulares das células rompidas - extração com clorofórmio:metanol (2:1) associada ao uso do ultrassom por 20min. Seta vermelha aponta os detritos. Em todos os mecanismos de rompimento celular testados foram observados detritos celulares.

No ultrassom, a energia elétrica é transformada em energia mecânica através de transdutores ultra-sônicos que provocam uma vibração mecânica a certa frequência. Essa energia mecânica é chamada de cavitação ultrassônica e sua característica mais importante é causar vibrações microscópicas que atuam como milhões de micro explosões. O efeito químico da cavitação ultrassônica é a geração de radicais altamente reativos devido à dissociação de algumas moléculas. Além disso, a implosão de bolhas de cavitação no interior do organismo em consequência ao uso do ultrassom pode contribuir para ruptura da parede celular (MASON, PANIWNYK & LORIMER, 1996).

Dependendo da qualidade da ruptura celular, podem ser evitadas grandes quantidades de solventes de modo que a extração seja mais eficiente. É válido lembrar que, industrialmente, o processo de rompimento celular deve ser o mais eficiente tanto energético como economicamente. Portanto, é lógico pensar que uma avaliação de custo *versus* benefício deve ser feita para a escolha de tecnologias que visam à quebra da parede celular durante a extração lipídica.

Os estudos realizados na primeira fase do presente trabalho definiram como melhor protocolo a extração com clorofórmio:metanol (2:1) auxiliada pelo uso de ultrassom. Também foi feita a análise do perfil de ácidos graxos através do processo de transesterificação utilizando o lipídio total extraído por esse protocolo. Os principais picos presentes no cromatograma de íons totais (CIT) foram retidos entre 3 e 31min. A composição em ácidos graxos foi obtida através dos espectros de massas de seus derivados ésteres metílicos, por consulta à biblioteca digital de espectros de massas padrão Wiley7Nist05. A composição quantitativa apresentada foi obtida pelo método de normalização de áreas, onde o percentual indicado corresponde à contribuição de cada pico em área sobre o total de áreas de todos os picos. O CIT do lipídio extraído com clorofórmio:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom está ilustrado na figura 9 e os resultados da análise resumidos na tabela VIII.

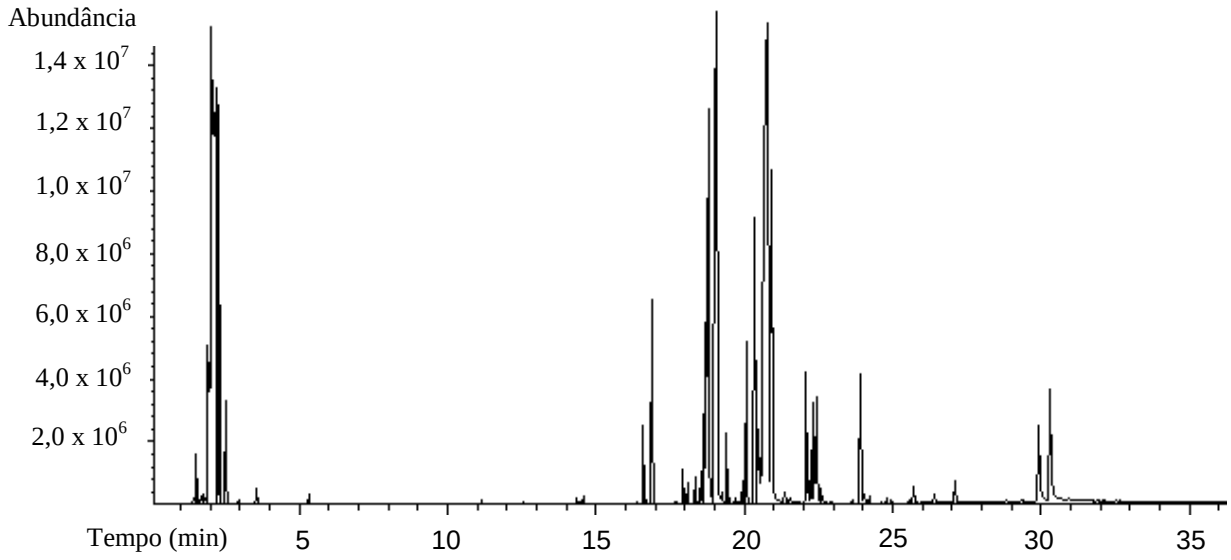


Figura 9. Cromatograma de íons do produto da reação de transesterificação. A reação de transesterificação foi realizada a partir do lipídio extraído com clorofórmio:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom.

Tabela VIII. Composição percentual relativa dos lipídios extraídos com clorofórmio:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom. Em negrito os ácidos graxos insaturados.

Tempo de retenção (min.)	Quantidade relativa (%)	Indicativo para os seguintes compostos
14,558	0,053	Ácido dodecanóico (Ácido láurico)
16,881	2,097	Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)
17,937	0,278	Ácido pentadecanóico
18,679	**2,669**	**Ácido 7,10 - Hexadecadienóico**
18,776	**8,386**	**Ácido 7,10,13 - Hexadecatrienóico + hexadecenóico (Ácido palmitoléico)**
19,065	20,688	Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)
19,934	0,232	Ácido heptadecanóico (Ácido margárico)
20,471	**0,868**	**Ácido 6,9,12 - octadecatrienóico (Ácido gama-linoléico)**
20,538	**1,148**	**Ácido 9,12,15 - Octadecatrienóico (Ácido linolênico)**
20,642-20,785	**35,722**	**Ácido 9,12 - Octadecadienóico (Ácido linoléico)**
20,912	5,767	Ácido octadecanóico (Ácido esteárico)
22,089	**1,38**	**Ácido 5,8,11,14 - eicosatetraenóico (Ácido araquidônico)**
22,149	**0,489**	**Ácido 5,8,11,14,17 - eicosapentaenóico**
22,227	**0,279**	**Ácido 7,10,13 - eicosatrienóico**
22,378	**0,323**	**Ácido 8,11 - eicosadienóico**
22,415	**1,758**	**Ácido 11 - eicosenóico + Ácido 11,14,17 - eicosatrienóico**
22,602	0,233	Ácido - eicosanóico (Ácido araquídico)
24,032	**0,16**	**Ácido 13-docosenóico (Ácido erúcico)**
24,213	0,087	Ácido docosanóico (Ácido behênico)
24,943	0,054	Ácido tricosanóico
25,703	0,179	Ácido tetracosanóico (Ácido lignocérico)
26,415	0,106	Ácido pentacosanóico
27,097	0,244	Ácido hexacosanóico

A determinação das características do biodiesel é feita mediante o emprego das normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais "*American Society for Testing and Materials*" (ASTM), da "*International Organization for Standardization*" (ISO) e do "*Comité Européen de Normalisation*" (CEN).

Os óleos insaturados produzem um biodiesel mais susceptível à oxidação devido à sua instabilidade quando armazenado por muito tempo, desse modo, o perfil de ácidos graxos é principalmente avaliado em relação aos teores de PUFAs (HU *et al.*, 2008). No produto de transesterificação da extração com clorofórmio:metanol (2:1) foram detectados cerca de 21% de ácido palmítico, 36% de ácido linoléico, 1,1% de ácido linolênico, 1,4% de ácido araquidônico e 24% de outros ácidos.

Em 2009, Converti e colaboradores avaliaram a eficiência de diferentes protocolos de extração lipídica para biomassa de *Nannochloropsis oculata* obtida a 20ºC e 70μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$. O protocolo de "Folch" associado ao uso de ultrassom (extraindo 24,3% LT em 6h) também se mostrou mais eficiente quando comparado ao "Folch" original (7,0% LT em 1.5h), uso de éter de petróleo (7,2% LT em 4h), éter de petróleo associado ao *soxhlet* (8,2% LT em 4h) e éter de petróleo associado ao ultrassom (3,3% LT em 6h).

Montes D'Oca e colaboradores (2011) testaram a eficiência de alguns protocolos de extração lipídica utilizando biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* obtida comercialmente. Para a extração lipídica, os autores utilizaram como solventes a mistura clorofórmio:metanol (2:1), metanol, etanol, clorofórmio e hexano, todos associados ao uso de ultrassom durante 20min. Dentre os protocolos testados, novamente a mistura clorofórmio:metanol se mostrou mais eficiente (extraindo 12,29% LT) em relação ao metanol (4,02% LT), etanol (1,96% LT), clorofórmio (7,54% LT) e hexano (0,37% LT).

Recentemente Araujo e colaboradores (2013) compararam cinco métodos de extração lipídica em biomassa de *Chlorella vulgaris*: "Bligh & Dyer" associado ao uso de ultrassom por 60min, diclorometano:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom por 30min, "Folch" associado ao uso de ultrassom por 30min, isopropanol:hexano (1:1,5) associado ao uso de ultrassom por 60min e acetona associada ao *soxhlet* por 8h. A biomassa foi obtida a 22±2°C, 20μmol de fótons.$cm^{-2}s^{-1}$ e fotoperíodo de ciclo claro e escuro 18:6. Nesse caso, o protocolo segundo "Bligh & Dyer" se mostrou mais eficiente

(extraindo 52,3% LT) frente ao diclorometano:metanol (10,9% LT), “Folch” (16,1% LT), isopropanol:hexano (2,2% LT) e *Soxhlet* (1,8% LT). Araujo e colaboradores ainda avaliaram a composição dos ácidos graxos para todos os protocolos estudados e afirmaram não haver diferença na composição final de óleo em função dos métodos de extração. Na biomassa de *C. vulgaris* obtida sob diferentes condições de cultivo das que aqui foram mostradas, foram detectados 39% de ácido palmítico, 16% de ácido linoléico, 23% de ácido oléico, 3% de ácido linolênico e 19% de outros ácidos graxos.

5.2 - Avaliação de diferentes condições de cultivo

5.2.1 - Concentração de nitrato x Concentração de fosfato

Pelo fato dos lipídios serem macromoléculas intracelulares e a sua extração levar ao rompimento celular, em cultivos de microalgas parte da biomassa obtida pode ser utilizada como inóculo em uma nova batelada enquanto que outra parte é rompida para a extração lipídica. Sabendo que o aumento do conteúdo lipídico está relacionado às condições limitantes de nitrogênio, e que ao mesmo tempo a ausência de nitrogênio impossibilita o crescimento celular; tentativas para aumentar a produtividade em lipídios podem reduzir a produtividade em biomassa de modo a prejudicar o inóculo de futuras gerações. Nesse sentido, no presente trabalho foi feita uma avaliação prévia para maximização da produção de biomassa seguida de estratégia para o aumento do teor lipídico, de forma a alcançar de fato uma maior produtividade em lipídios.

No processo de obtenção de biomassa foram estudadas inicialmente como variáveis independentes do planejamento experimental as concentrações de nitrato de sódio e fosfato de potássio dibásico do meio de cultura. Como variável dependente foi avaliada a produtividade em biomassa, sendo obtida por quantificação diária do peso seco. A taxa de crescimento foi determinada por leituras diárias de DO_{730nm}. A tabela IX lista a taxa de crescimento e a produtividade em biomassa obtida em cada ensaio, enquanto as tabelas X e XI apresentam a análise de variância e o resumo estatístico, respectivamente.

Tabela IX. Matriz de níveis do planejamento experimental com valores preditos (em negrito) e experimentais da produtividade em biomassa, além da taxa de crescimento. Enquanto X_1 representa $NaNO_3$, X_2 representa K_2HPO_4.

Ensaios	X_1	X_2	μ (d^{-1})	P_b ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	P_b ($g.L^{-1}.d^{-1}$)
Garrafão 1	-1	-1	0,129	0,021	**0,025**
Garrafão 2	+1	-1	0,171	0,028	**0,032**
Garrafão 3	-1	+1	0,026	0,011	**0,015**
Garrafão 4	+1	+1	0,243	0,025	**0,030**
Garrafão 5	0	0	0,143	0,030	**0,025**
Garrafão 6	0	0	0,137	0,020	**0,025**
Garrafão 7	0	0	0,148	0,038	**0,025**

Tabela X. Análise de variância para a resposta.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de *F*	*p*- valor Prob>*F*
Modelo	1,729E-004	3	5.762E-005	0.62	0.6484
X_1	1,133E-004	1	1.133E-004	1.22	0.3504
X_2	4,210E-005	1	4.210E-005	0.45	0.5494
X_1X_2	1,743E-005	1	1.743E-005	0.19	0.6944
Residual	2,793E-004	3	9.309E-005		
Falta de ajuste	1,170E-004	1	1.170E-004	1.44	0.3528
Erro puro	1,623E-004	2	8.115E-005		

Tabela XI. Resumo estatístico do modelo**.**

Desvio padrão	9,648E-003	R^2	0,3823
Média	0,025	R^2 ajustado	-0,2353
		R^2 predito	-9,3474

O modelo matemático que representa a produtividade em biomassa na região experimental estudada pode ser expresso pela equação a seguir:

$$Pb\ (g.L^{-1}.d^{-1}) = 0{,}025 + 5{,}323E\text{-}003\ X_1 - 3{,}422E\text{-}003\ X_2 + 2{,}087E\text{-}003\ X_1\ X_2\ \pm 3{,}68E\text{-}003$$

Valores de “Prob>*F*” menores que 0,05 (α =95%) indicam que os termos são significativos. Nesse caso nenhum termo foi significativo. Na análise de variância, a curvatura (não significativa) foi tratada como falta de ajuste. A falta de ajuste ao modelo é também observada no baixo valor de R^2 (0,3823). A diferença entre os valores preditos e os valores experimentais, bem como o alto erro experimental podem ser justificados por uma possível diferença na intensidade luz. Embora todas as culturas estivessem submetidas às mesmas condições de temperatura e agitação, os garrafões foram alocados em prateleiras diferentes na estante e diferentes posições podem ter sido favorecidas por mais ou menos intensidade luminosa. Com o intuito de corrigir essa situação, os garrafões subsequentes foram mantidos em sistema de rodízio diário para garantir que todas as culturas estivessem sob as mesmas intensidades de luz.

De modo geral o modelo obtido não representa matematicamente a produtividade em biomassa na região estudada, sugerindo a repetição dos experimentos. Ainda que os resultados obtidos não sejam válidos estatisticamente, torna-se importante analisar alguns gráficos gerados pelo programa como possível forma de direcionamento no desenvolvimento de um novo desenho experimental.

Na análise individual das variáveis (figuras 10 e 11) foi possível observar que um aumento na concentração de nitrato teve influência positiva sobre a resposta. Ao passar a concentração de nitrato do nível -1 para o nível +1 (eixo das abscissas) a produtividade em biomassa aumentou. Esse efeito positivo pode ser observado no modelo matemático através do valor + 5,323E-003 X_1. Em relação ao aumento da concentração de fosfato, este apresentou efeito negativo (– 3,422E-003 X_2). Ao passar a concentração de fosfato do nível -1 para o nível +1 ocorreu uma queda na produtividade em biomassa. A influência da concentração de nitrato sobre a resposta foi maior que a influência da concentração de fosfato (|5,323E-003| >|3,422E-003|).

No gráfico de interação das variáveis (figura 12), o grau de interação pode ser caracterizado pela posição das retas: retas cruzadas representam forte interação e retas paralelas estão relacionadas a uma fraca ou ausente interação. Nesse caso, em que as retas não estão nem cruzadas nem paralelas, as variáveis podem ser caracterizadas como média interação. No nível -1 de nitrato (eixo das abscissas), a combinação com o nível -1 de fosfato (reta preta) apresentou maior produtividade em biomassa quando comparado ao

nível +1 de fosfato (reta vermelha). Ao aumentar a concentração de nitrato (nível +1), as variações de fosfato não apresentaram diferença no resultado, sendo novamente a produtividade em biomassa maior no nível -1 de fosfato.

Quando o fosfato foi utilizado em sua condição +1 ocorreu maior influência sobre a resposta que quando utilizado na condição -1 (reta vermelha com maior ângulo de inclinação). Embora com diferentes influências, a produtividade final em biomassa se manteve maior com o fosfato em seu nível -1, independente da concentração de nitrato. No direcionamento de um novo planejamento, a concentração de fosfato poderia ser fixada em seu nível mais baixo (4,49mg.L^{-1} K_2HPO_4) ou ainda avaliada em concentrações inferiores as estudadas. Já a concentração de nitrato poderia ser fixada em seu nível mais alto (120mg.L^{-1}) ou avaliada em concentrações superiores as estudadas.

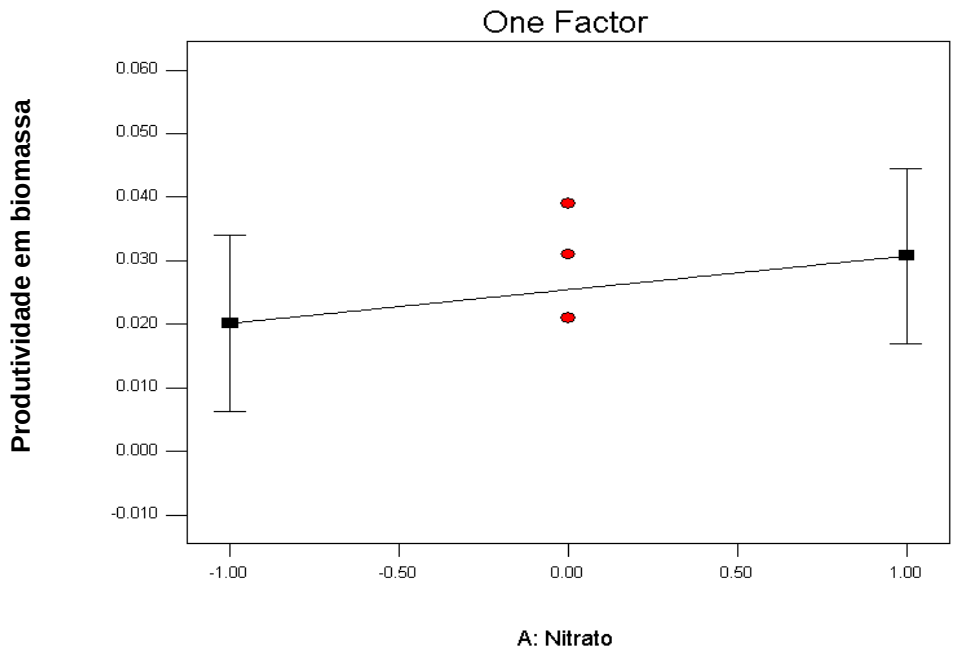


Figura 10. Análise da concentração de nitrato sobre a produtividade em biomassa. Eixo das abscissas corresponde aos valores codificados de nitrato. Eixo das ordenadas representa os valores obtidos para a produtividade em biomassa. As barras na vertical representam o erro experimental. Os círculos representam os pontos centrais.

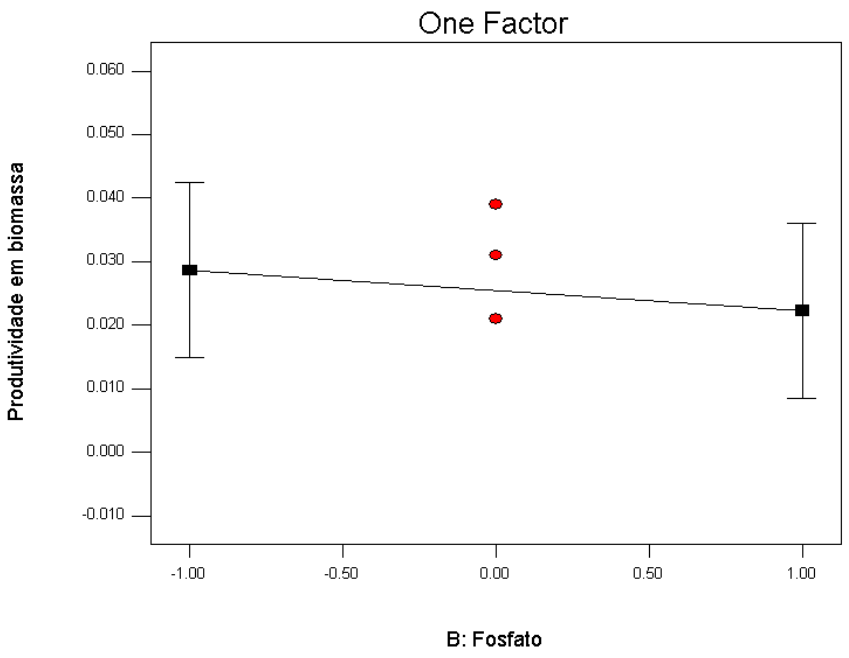


Figura 11. Análise da concentração de fosfato sobre a produtividade em biomassa. Eixo das abscissas corresponde aos valores codificados de fosfato. Eixo das ordenadas representa os valores obtidos para a produtividade em biomassa. As barras na vertical representam o erro experimental. Os círculos representam os pontos centrais.

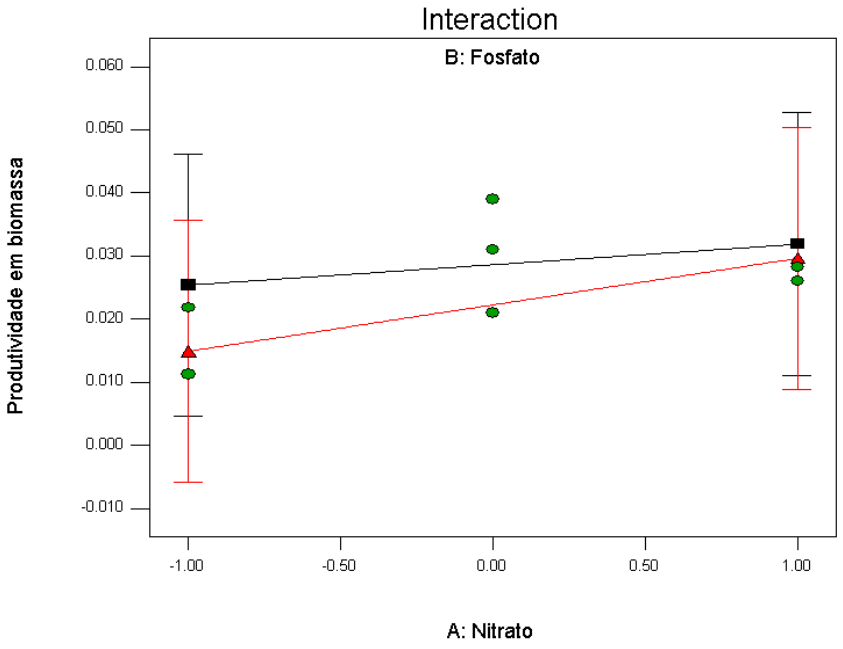


Figura 12. Interação da concentração de nitrato e concentração de fosfato. Eixo das abscissas corresponde aos valores codificados de nitrato. Eixo das ordenadas representa os valores obtidos para a produtividade em biomassa. Reta preta corresponde à concentração de fosfato em seu nível -1 e reta vermelha corresponde à concentração de fosfato em seu nível +1. As barras na vertical representam o erro experimental. Os círculos no centro do gráfico representam os pontos centrais, enquanto os círculos nas extremidades representam os ensaios.

5.2.2 – Concentração de nitrato x Inóculo inicial de células

Como resultado do primeiro planejamento experimental, o fosfato foi fixado em seu ponto mínimo (4,49mg.L^{-1} K_2HPO_4) enquanto o nitrato foi avaliado em maiores concentrações. Em um segundo desenho experimental, foram estudadas como variáveis independentes as concentrações de nitrato e o inóculo inicial de células. Como variável dependente foi avaliada a produtividade em biomassa sendo determinada por quantificação diária do peso seco. A taxa de crescimento foi definida por observações diárias de DO_{730nm}. A tabela XII lista a taxa de crescimento e a produtividade em biomassa obtida em cada ensaio, assim como as tabelas XIII e XIV apresentam a análise de variância para as respostas obtidas e o resumo estatístico, respectivamente.

Tabela XII. Matriz de níveis do segundo planejamento experimental com valores preditos (em negrito) e experimentais da produtividade em biomassa, além da taxa de crescimento. Assim como X_1 representa $NaNO_3$, X_2 representa o inóculo inicial de células.

Ensaios	X_1	X_2	μ (d^{-1})	P_b ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	P_b ($g.L^{-1}.d^{-1}$)
Garrafão 1	-1	-1	0,550	0,025	**0,026**
Garrafão 2	+1	-1	0,574	0,026	**0,026**
Garrafão 3	-1	+1	0,157	0,029	**0,033**
Garrafão 4	+1	+1	0,151	0,033	**0,037**
Garrafão 5	0	0	0,275	0,032	**0,033**
Garrafão 6	0	0	0,327	0,032	**0,033**
Garrafão 7	0	0	0,334	0,033	**0,033**

Tabela XIII. Análise de variância para a resposta obtida no segundo planejamento.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de *F*	*p*- valor Prob>*F*
Modelo	3,814E-005	3	1,271E-005	43,46	0,0226
X_1	6,250E-006	1	6,250E-006	21,37	0,0438
X_2	2,870E-005	1	2,870E-005	98,11	0,0100
X_1X_2	3,189E-006	1	3,189E-006	10,90	0,0808
Curvatura	3,237E-005	1	3,237E-005	110,65	0,0089
Erro puro	5,850E-006	2	2,925E-007		

Tabela XIV. Resumo estatístico do modelo do segundo planejamento.

Desvio padrão	3,314E-003	R^2	0,5365
Média	0,030	R^2 ajustado	0,7029
		R^2 predito	-16,3633

O modelo matemático que representa a produtividade em biomassa na região experimental estudada pode ser expresso pela equação a seguir:

$$Pb\ (g.L^{-1}.d^{-1}) = 0{,}030 + 1{,}250E\text{-}003\ X_1 + 2{,}679E\text{-}003\ X_2 + 8{,}929E\text{-}004\ X_1\ X_2 \pm 2{,}70E\text{-}004$$

Uma vez que, valores "Prob>*F*" menores que 0,05 indicam significância nos termos avaliados, foram significativos estatisticamente o modelo, a concentração de nitrato, o inóculo inicial de células e a curvatura. Embora grande parte dos valores experimentais tenha sido parecido com os valores preditos, foi observado uma diferença nos ensaios 3 e 4, sendo encontrado um R^2 de 0,5365. Os resultados aqui mostrados permitem a utilização do modelo matemático para a área de estudo avaliada.

Quando a concentração celular foi a mesma em todos os ensaios (primeiro desenho experimental), de modo geral, maiores taxas de crescimento também foram maiores produtividade em biomassa. Ao variar a concentração inicial de células, a taxa de crescimento passou a ser inversamente proporcional à concentração celular e não apresentou mais relação com a produtividade. Ensaios com menor inóculo inicial apresentaram maior taxa de crescimento quando comparados aos ensaios com maior inóculo.

Na análise individual das variáveis (figuras 13 e 14) foi possível observar que ao passar a concentração de nitrato do nível -1 para o nível +1 a produtividade em biomassa aumentou, sendo esse efeito positivo quantificado pelo valor + 1,250E-003. O mesmo foi observado ao aumentar o inóculo inicial de células do nível -1 para o nível +1. Nesse caso, o efeito da variável X_2 foi maior do que o efeito da variável X_1 (|2,679E-003| >|1,250E-003|).

No gráfico de interação (figura 15), as variáveis apresentam média interação. A interação das variáveis gera um efeito maior que quando observadas separadamente (|8,929E-003| >|2,679E-003|>|1,250E-003|). Tanto no nível -1 quanto no nível +1 de nitrato (eixo das abscissas), a maior produtividade em biomassa foi obtida quando combinado com

o nível +1 do inóculo inicial de células (reta vermelha). Contudo, é ainda observada uma maior produtividade no nível +1 de nitrato e nível +1 do inóculo inicial de células.

Quando as células estão em sua concentração mais baixa (reta preta), utilizar mais ou menos nitrato não interfere na resposta final de produtividade em biomassa. Já em elevada concentração celular (reta vermelha), aumentar a concentração de nitrato promove um efeito significativo na produtividade em biomassa (reta vermelha com maior ângulo de inclinação). A figura 16 relaciona a produtividade em biomassa com a concentração de nitrato e o inóculo inicial de células. A região vermelha indica a área de maior produtividade (1,21g.L^{-1} de $NaNO_3$ e DO_{730nm} inicial de células de 0,2).

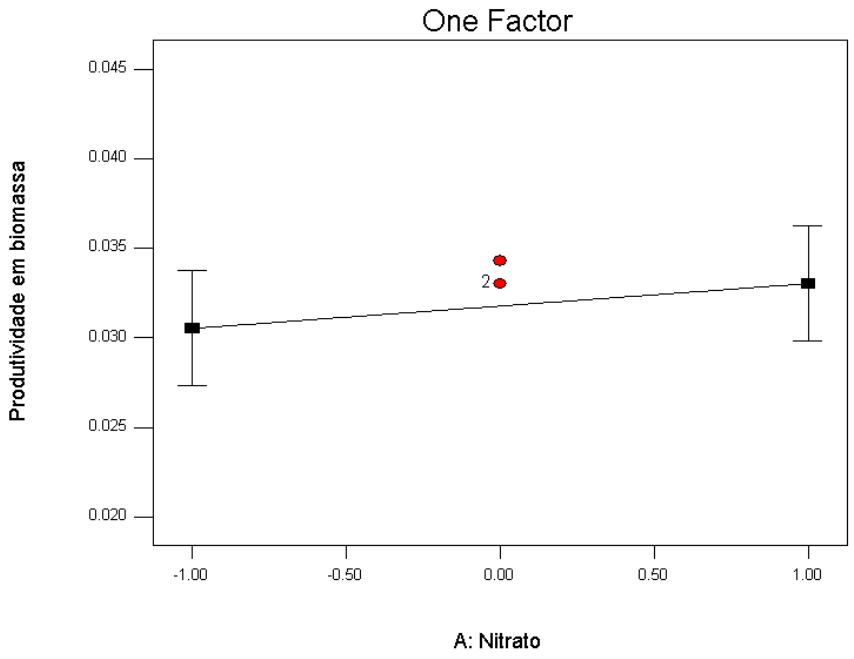


Figura 133. Análise da concentração de nitrato durante o segundo planejamento. Eixo das abscissas corresponde aos valores codificados de nitrato. Eixo das ordenadas representa os valores obtidos para a produtividade em biomassa. As barras na vertical representam o erro experimental. Os círculos representam os pontos centrais, estando dois PC no mesmo ponto.

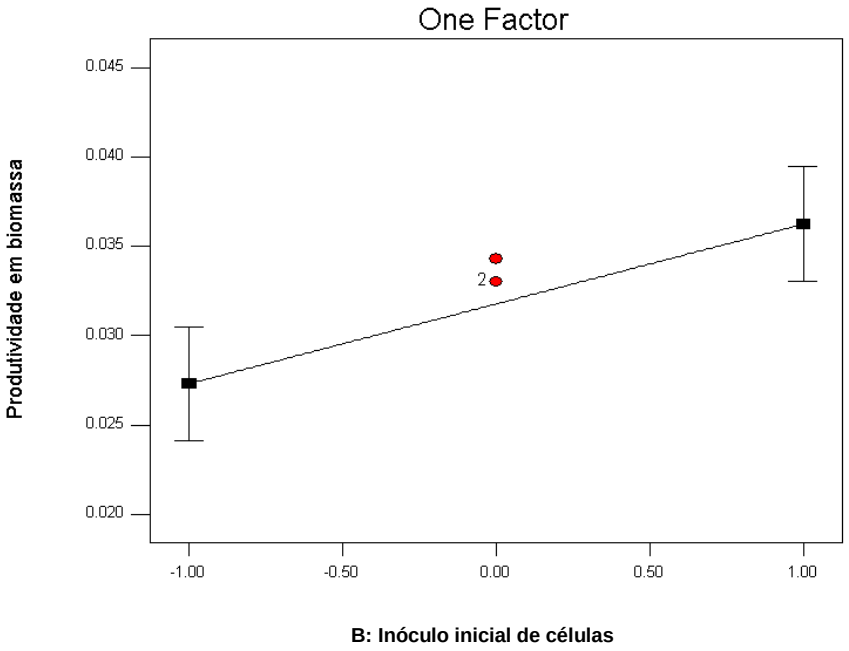


Figura 144. Análise do inóculo inicial de células sobre a produtividade em biomassa. Eixo das abscissas corresponde aos valores codificados do inóculo. Eixo das ordenadas representa os valores obtidos para a produtividade em biomassa. As barras na vertical representam o erro experimental. Os círculos representam os pontos centrais, estando dois PC no mesmo ponto.

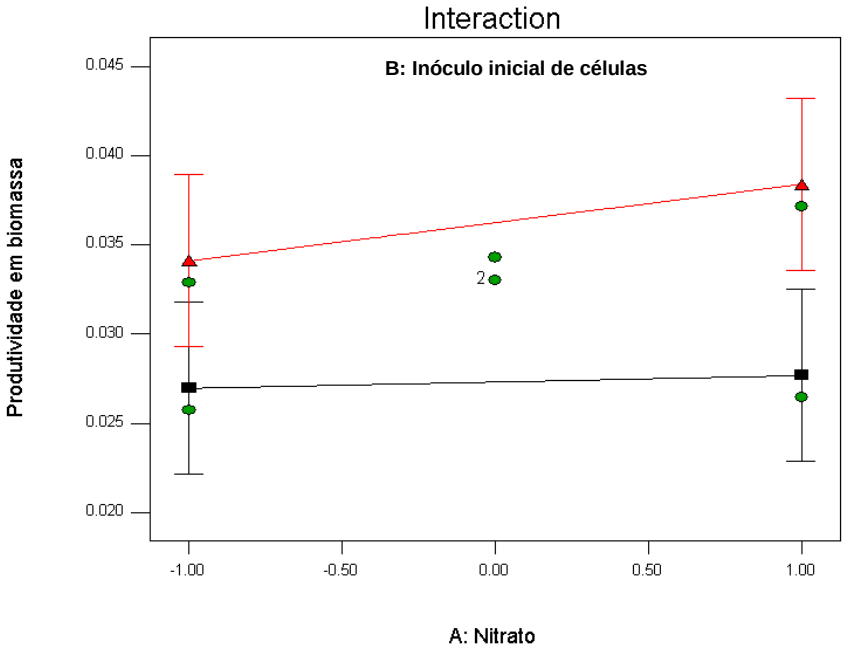


Figura 155. Interação do inóculo inicial de células e concentração de nitrato. Eixo das abscissas corresponde aos valores codificados de nitrato. Eixo das ordenadas representa os valores obtidos para a produtividade em biomassa. Reta preta corresponde ao inóculo inicial de células em seu nível -1, enquanto a reta vermelha corresponde ao inóculo inicial de células em seu nível +1. As barras na vertical representam o erro experimental. Os círculos no centro do gráfico representam os pontos centrais, enquanto os círculos nas extremidades representam os ensaios.

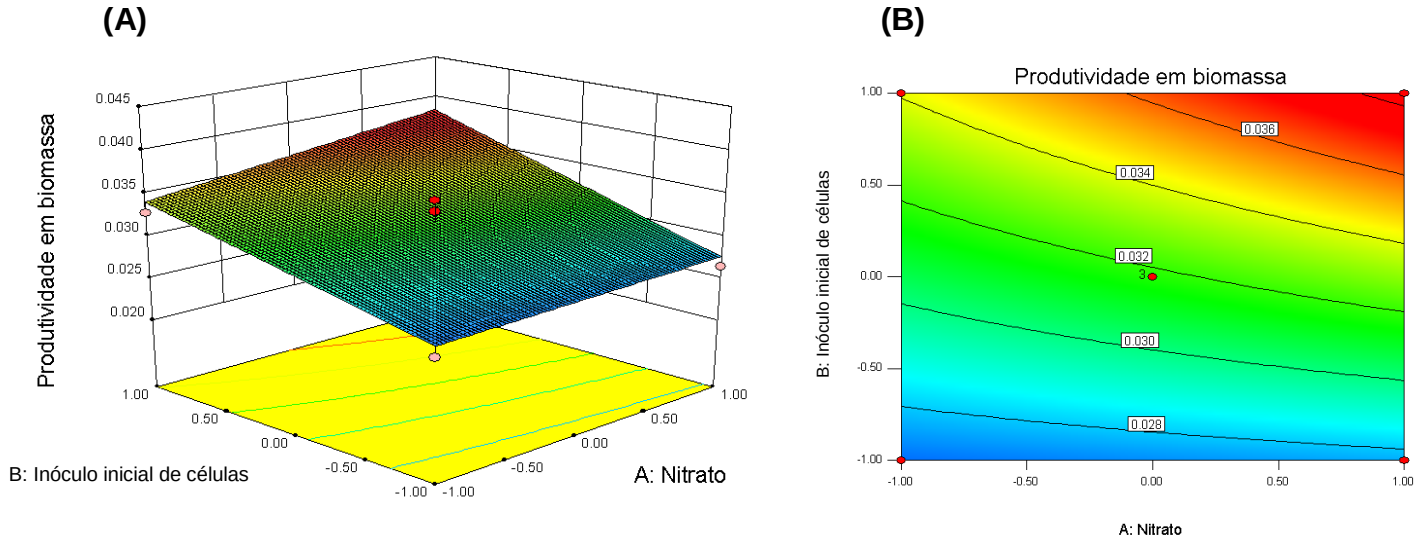


Figura 166. Produtividade em biomassa em relação ao inóculo inicial de células e à concentração de nitrato no meio de cultura. (A) Gráfico tridimensional das respostas. Região vermelha tende a gerar maior produtividade em biomassa (B). Região de maior produtividade ampliada.

Como etapa fundamental na metodologia do planejamento experimental, o resultado final passou por uma etapa de validação. Para confirmação das melhores condições de cultivo visando à maximização da biomassa, foram repetidas as condições experimentais do segundo planejamento. A biomassa foi cultivada nas seguintes condições: 4,49mg.L^{-1} de K_2HPO_4; 1,21g.L^{-1} de $NaNO_3$ e DO_{730nm} inicial de 0,2. A produtividade em biomassa ao final do cultivo foi determinada por quantificação do peso seco. Como resultado final foi obtida uma produtividade em biomassa de 0,031g.L^{-1}.d^{-1}, a qual corrobora com o resultado obtido no planejamento nas mesmas condições mencionadas (0,033g.L^{-1}.d^{-1}).

Quando a concentração de nitrato foi ampliada e a concentração de fosfato reduzida, durante o primeiro desenho experimental, observou-se um aumento na produtividade em biomassa, passando de aproximadamente 0,016g.L^{-1}.d^{-1} (REZENDE *et al*., 2012) para 0,028g.L^{-1}.d^{-1}. Após o segundo desenho experimental, com aumento da concentração de nitrato e do inóculo inicial de células, obteve-se uma produtividade ainda superior de 0,033g.L^{-1}.d^{-1}. O maior resultado em produtividade foi alcançado principalmente em função da redução do tempo de cultivo necessário à obtenção de biomassa, passando de aproximadamente 25 dias (REZENDE *et al*., 2012) para 13 dias de cultivo.

O menor tempo de cultivo foi proporcionado não só pelas elevadas quantidades de nitrato, que possibilitou a realização de diversas reações metabólicas necessárias ao crescimento celular, como também pelo maior inóculo celular. Contudo alguns aspectos necessitam ser avaliados tais como: custo versus benefício do aumento da concentração de nitrato e inóculo celular ideal para obtenção de biomassa.

A redução no tempo de cultivo reduz custos do processo, como por exemplo, a energia necessária ao funcionamento do sistema de cultivo. Muitas vezes o custo do meio de cultura ainda é inferior ao gasto energético necessário para manutenção de um sistema de cultivo em uma planta piloto (DUERR, EDRALIN & PRICE, 1997).

Em relação à concentração inicial de células, o inóculo na fase exponencial (DO_{730nm} 0,2), apresenta como vantagem a redução da fase *lag* de crescimento. Nesse caso as células já ultrapassaram a fase de adaptação e como estão sendo inoculadas em um meio mais rico (maior concentração de nitrato e a redução de fosfato não é significativa) estabelecem imediato crescimento exponencial. Embora pareça lógico que uma maior concentração celular favoreça a obtenção final de biomassa, é importante que o inóculo inicial esteja em sua fase exponencial. Isso porque na fase exponencial, as células geralmente se encontram em condições mais "saudáveis" e com o metabolismo acelerado.

Ainda que sejam encontrados muitos relatos sobre a produtividade de *Chlorella vulgaris*, muitas vezes torna-se difícil a comparação entre os dados obtidos em função das diferentes condições descritas, como intensidade de luz e aeração. Em 2009, Liang, Sarkany & Cui compararam a produtividade em biomassa para *Chlorella vulgaris* quando mantida sob diversas condições de cultivo. Em cultivo autotrófico, as células foram cultivadas nas seguintes condições: 0,18g.L^{-1} de íon nitrato; 0,16g.L^{-1} de íon fosfato; vazão de ar de 200mL.min^{-1}; e luz fluorescente constante. Após 23 dias de crescimento celular, foi obtida uma produtividade em biomassa de 0,010g.L^{-1}.d^{-1}.

Embora alguns autores estejam obtendo maiores produtividades em biomassa, na grande maioria das vezes ocorre a injeção de CO_2, como no trabalho de Ming Lv e colaboradores (2010) que avaliaram o crescimento celular de *Chlorella vulgaris* sob diferentes condições de cultivo. Dentre algumas situações, a célula foi cultivada em: 0,31g.L^{-1} de íon nitrato; 6,99g.L^{-1} de íon fosfato; sob aeração com ar enriquecido com CO_2 a 1,0% em uma vazão de 1,2L.min^{-1}; iluminação constante de 60μmol de fótons.m^{-2}s^{-1}; e

temperatura de 25ºC. Ao final de 4 dias de cultivo, foi obtida uma produtividade em torno de 0,26g.L^{-1}.d^{-1}. Nesse trabalho os autores avaliaram também o consumo de nitrato, o qual foi zerado ao final dos 4 dias de cultivo.

Em 2012, Kim e colaboradores otimizaram as condições de cultivo através do planejamento experimental e compararam a produtividade em biomassa para três algas verdes. Como variáveis independentes foram avaliadas as concentrações de cloreto de amônio, fosfato de potássio dibásico e pH do meio de cultura. A variável dependente observada foi a produtividade em biomassa após 11 dias de cultivo. As células foram mantidas sob sistema de ciclo claro e escuro 12:12, 27ºC, 100μmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e a densidade celular determinada através do DO_{682nm}. A máxima produtividade obtida para *Chlorella* sp. foi de 0,091g.L^{-1}.d^{-1} quando cultivada em 20mM de NH_4Cl (ou 0,28g.L^{-1} de nitrogênio, para efeito de comparação a quantidade de 1,21g.L^{-1} de $NaNO_3$ utilizada no presente trabalho corresponde a 0,20g.L^{-1} de nitrogênio); 0,19g.L^{-1} de íon fosfato e pH 7,0.

Uma vez otimizadas as condições de cultivo, foi avaliada a produtividade em biomassa em diferentes concentrações de CO_2 em fotobiorreator tubular fechado. Os melhores resultados foram observados quando se utilizou o ar enriquecido com CO_2 a 1,0%. Nesse caso foi obtida um taxa específica de crescimento igual a 0,58d^{-1} e uma produtividade em biomassa de 0,28g.L^{-1}.d^{-1}.

5.3 - Aplicação de condição de estresse no meio de cultivo

Uma vez determinadas as melhores condições para crescimento celular de *C. vulgaris*, tais condições foram reproduzidas visando à obtenção de biomassa. Após o crescimento (1ª etapa), parte da biomassa foi centrifugada e liofilizada para avaliação de seu conteúdo lipídico e outra parte centrifugada foi lavada e inoculada em "meio de estresse", isento de nitrato de sódio (2ª etapa). Ao final de quatro dias a biomassa foi novamente centrifugada, liofilizada e analisada quanto ao seu teor e perfil lipídico. A produtividade em biomassa ao final de cada etapa foi avaliada através do peso seco. A figura 17 mostra o crescimento celular (escala logarítmica) em diferentes etapas de cultivo.

A tabela XV resume as avaliações após a 1ª e a 2ª etapa de cultivo. À exceção da produtividade em biomassa que reduziu, os demais termos avaliados foram favorecidos pela condição limitante de nitrato no meio extracelular. Embora o teor de lipídios tenha

aumentado significativamente, a produtividade em lipídios não sofreu grandes mudanças devido à produtividade em biomassa que diminuiu.

No presente trabalho foi possível aumentar o teor de lipídios (de 19,6% pra 25,4%) realizando-se o cultivo em duas etapas sendo a segunda de ausência de nitrato no meio de cultura. Além disto, foi possível reduzir o tempo de cultivo de 25 dias para 17 dias, ao otimizar a concentração de nitrato, fosfato e DO_{730nm} inicial.

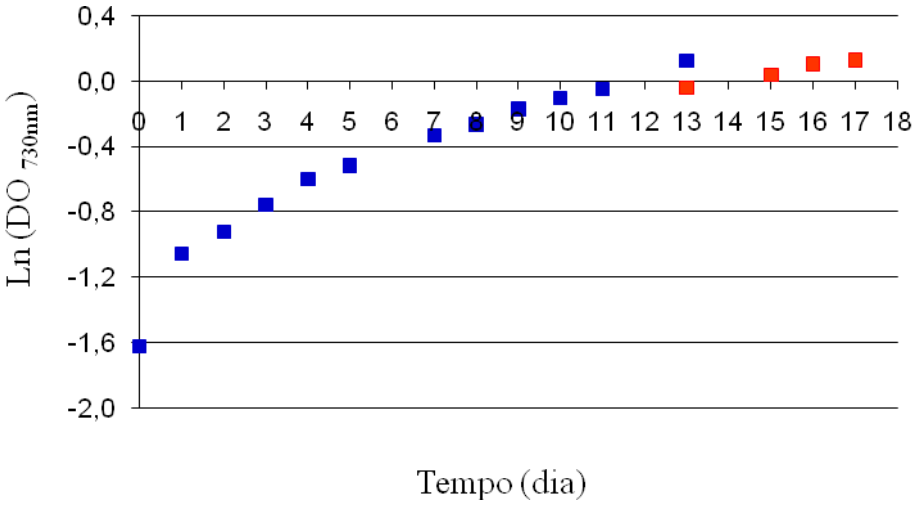


Figura 17. Crescimento celular em diferentes etapas de cultivo. (■) Condições favoráveis ao crescimento celular: 1,21g.L^{-1} de $NaNO_3$, 4,49g.L^{-1} de K_2HPO_4 e DO_{730nm} inicial de 0,2. Após alcançarem a fase estacionária de crescimento (DO_{730nm} = 1,022), as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em meio contendo 4,49g.L^{-1} de K_2HPO_4 e isento de $NaNO_3$. (■) Meio de estresse para induzir ao aumento da produtividade em lipídios. Com eficiência em torno de 97% de centrifugação, as células foram inoculadas em meio de estresse com DO_{730nm} de 0,997 e mantidas por mais 4 dias até alcançarem o DO_{730nm} de 1,058.

Tabela XV. Análise comparativa após 1ª e 2ª etapa de cultivo.

Avaliação	Antes Estresse	Depois Estresse
Produtividade em biomassa (g.L^{-1}.d^{-1})	0,032 ± 0,001	0,027 ± 0,004
Teor de lipídios (%)	19,6	25,4
Produtividade em lipídios (mg.L^{-1}.d^{-1})	6,65 ± 0,212	7,5 ± 0,141
Produtividade em TAG (mg.g^{-1}.d^{-1})	27,4 ± 0,707	31,3 ± 0,566

As figuras 18 e 19 ilustram o perfil cromatográfico dos lipídios extraídos após 1ª e 2ª etapa de cultivo, respectivamente. As tabelas XVI e XVII resumem os principais ácidos graxos encontrados. Após 1ª etapa de cultivo foram detectados cerca de 18% de ácido palmítico, 29% de ácido linoléico, 4% de ácido linolênico e 1,4% de ácido araquidônico. Após a indução de estresse o perfil cromatográfico apresentou 24% de ácido palmítico, 13% de ácido linoléico, 30% de ácido linolênico e 0,7% de ácido araquidônico.

Apesar de não haver restrições na regulamentação nacional, a norma EN14214 estabelece que o limite máximo aceitável para o teor de ácido linolênico é de 12%, e é de 1% o teor máximo admitido para os ácidos graxos com mais de três duplas ligações. Com base nessas informações conclui-se que o perfil de ácidos graxos após 1ª etapa de cultivo é mais adequado para a produção de biodiesel. No entanto, é válido relembrar que o conteúdo e perfil lipídico podem ser alterados em função das variações nas condições de cultivo.

Segundo levantamento da safra brasileira de grãos 2012/13, o cultivo de soja (principal matéria-prima utilizada para obtenção de biodiesel) tem ocupado uma área de 2.6879 mil hectares, com produtividade agrícola de 2.841 $Kg.ha^{-1}$ ($0,78g.m^{-2}.d^{-1}$) e produtividade em óleo de $559Kg.ha^{-1}$ ao ano (ou $0,15g.m^{-2}.d^{-1}$) (CONAB, 2012). Imaginando um tanque de cultivo de microalga com 30cm de altura, onde 1L de cultura ocupa uma área aproximadamente de $0,0033m^2$, a produtividade em biomassa após 17 dias para uma cultura com densidade de $0,5g.L^{-1}$ seria cerca de $8,9g.m^{-2}.d^{-1}$. Se essa biomassa apresentar ainda 25,4% de teor lipídico, a produtividade em lipídios decorridos os 17 dias de cultivo seria de $2,26g.m^{-2}.d^{-1}$. Nessas condições, a produtividade em biomassa de *C. vulgaris* seria 11 vezes superior à produtividade atingida pela soja, enquanto a produtividade em lipídios seria 15 vezes superior. Vale lembrar que parte da produção de soja está destinada a fins alimentícios, e a produtividade de soja citada se refere ao total da produção. Logo é lógico pensar que a quantidade de oleaginosa por hectares direcionada à produção de biodiesel é ainda menor.

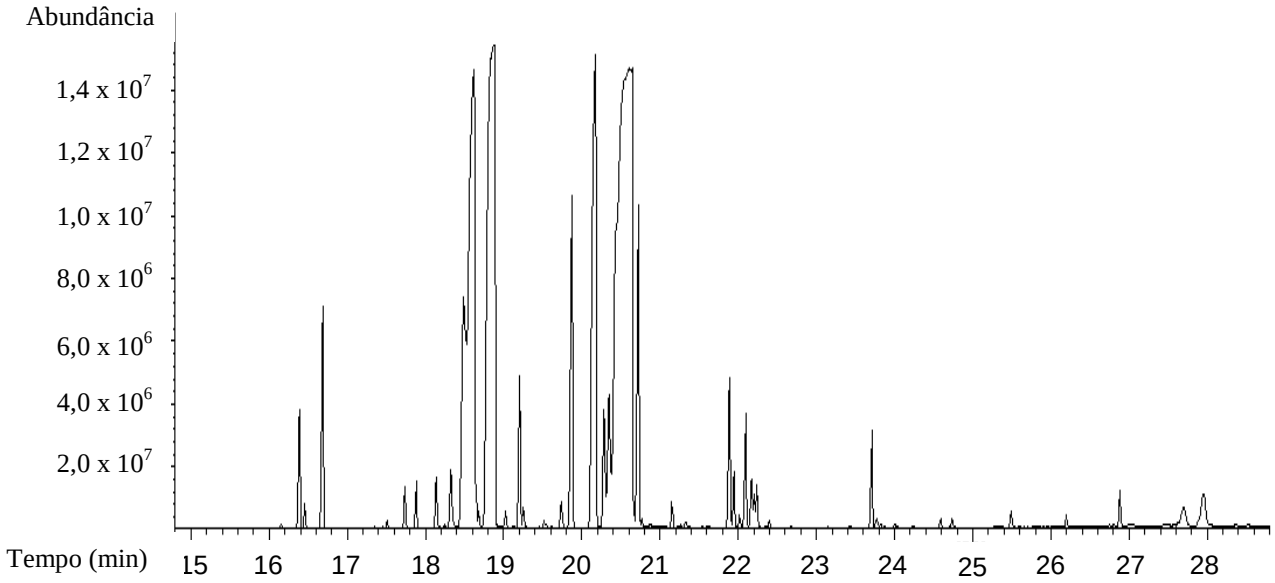


Figura 18. Cromatograma de íons do produto da reação de transesterificação. A reação de transesterificação foi realizada a partir do lipídio presente em biomassa obtida na 1ª etapa de cultivo.

Tabela XVI. Composição percentual relativa dos lipídios presentes em biomassa obtida na 1ª etapa de cultivo. Em negrito os ácidos graxos insaturados.

Tempo de retenção (min.)	Quantidade relativa (%)	Indicativo para os seguintes compostos
16,691	1,956	Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)
17,737	0,315	Ácido pentadecanóico
18,492	**4,835**	**Ácido 7,10 - Hexadecadienóico**
18,624	**13,126**	**Ácido 7,10,13 - Hexadecatrienóico + hexadecenóico (Ácido palmitoléico)**
18,883	17,572	Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)
19,737	0,277	Ácido heptadecanóico (Ácido margárico)
20,282	**1,202**	**Ácido 6,9,12 - octadecatrienóico (Ácido gama-linoléico)**
20,442	**28,533**	**Ácido 9,12 - Octadecadienóico (Ácido linoléico)**
20,646	**4,312**	**Ácido 9,12,15 - Octadecatrienóico (Ácido linolênico)**
20,723	2,784	Ácido octadecanóico (Ácido esteárico)
21,891	**1,378**	**Ácido 5,8,11,14 - eicosatetraenóico (Ácido araquidônico)**
21,946	**0,410**	**Ácido 5,8,11,14,17 - eicosapentaenóico**
22,023	**0,119**	**Ácido 7,10,13 - eicosatrienóico**
22,205	**0,256**	**Ácido 11 - eicosenóico + Ácido 11,14,17 - eicosatrienóico**
22,398	0,058	Ácido - eicosanóico (Ácido araquídico)
25,493	0,140	Ácido tetracosanóico (Ácido lignocérico)

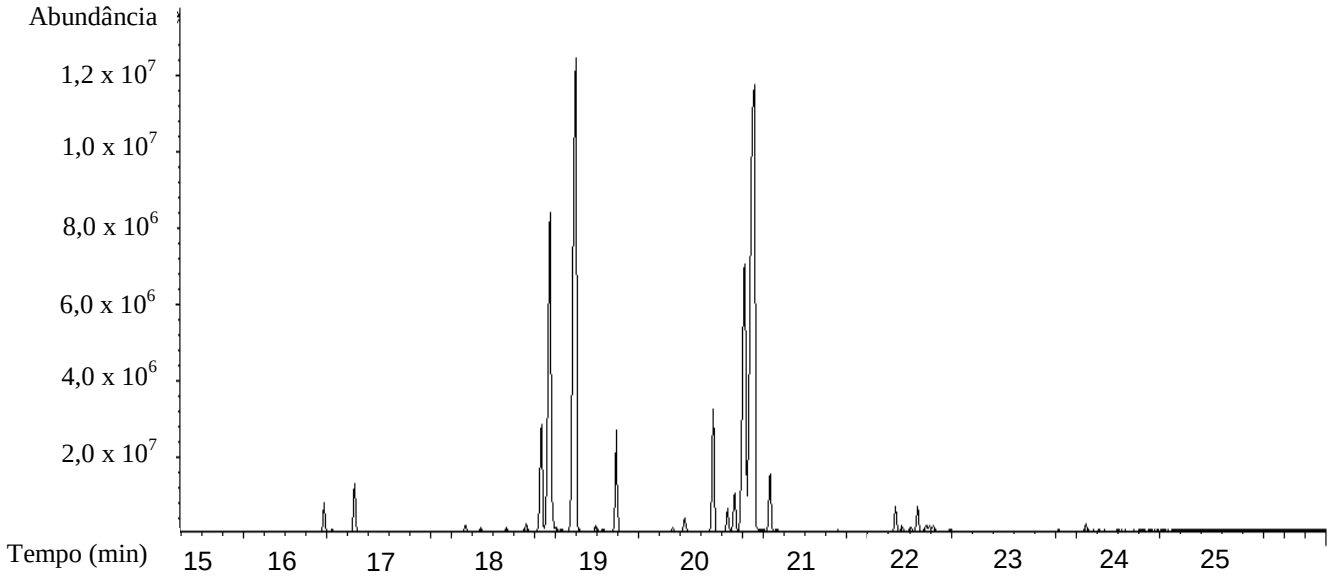


Figura 19. Cromatograma de íons do produto da reação de transesterificação. A reação de transesterificação foi realizada a partir do lipídio presente em biomassa obtida na 2ª etapa de cultivo (cultivo em ausência de nitrato).

Tabela XVII. Composição percentual relativa dos lipídios presentes em biomassa obtida na 2ª etapa de cultivo. Em negrito os ácidos graxos insaturados.

Tempo de retenção (min.)	Quantidade relativa (%)	Indicativo para os seguintes compostos
16,674	1,375	Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)
17,737	0,166	Ácido pentadecanóico
18,492	**3,768**	**Ácido 7,10 - Hexadecadienóico**
18,547	**12,908**	**Ácido 7,10,13 - Hexadecatrienóico + hexadecenóico (Ácido palmitoléico)**
18,795	23,649	Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)
19,726	0,102	Ácido heptadecanóico (Ácido margárico)
20,255	**0,694**	**Ácido 6,9,12 - octadecatrienóico (Ácido gama-linoléico)**
20,414	**12,859**	**Ácido 9,12 - Octadecadienóico (Ácido linoléico)**
20,508	**30,342**	**Ácido 9,12,15 - Octadecatrienóico (Ácido linolênico)**
20,662	1,773	Ácido octadecanóico (Ácido esteárico)
21,869	**0,684**	**Ácido 5,8,11,14 - eicosatetraenóico (Ácido araquidônico)**

Pela simples comparação feita anteriormente ficam claras as vantagens do uso de microalgas para produção de biodiesel, embora ainda sejam necessários outros estudos visando reduzir ainda mais o tempo de cultivo para aumentar significativamente a produtividade em lipídios. Quando Liang e colaboradores (2009) mantiveram *Chlorella vulgaris* sob condições autotróficas e sob ausência de íon nitrato, a produtividade em lipídios após 23 dias de cultivo foi de $4mg.L^{-1}.d^{-1}$. Nessas condições o teor lipídico obtido foi de 33%.

Quando Ming Lv e colaboradores (2010) cultivaram *Chlorella vulgaris* sob condições limitantes de nitrato de potássio, a produtividade em lipídios após 4 dias de cultivo ficou em torno de $40mg.L^{-1}.d^{-1}$.

Em 2012, Ling Yeh e colaboradores estimaram a influência de diferentes meios de cultivo na produtividade lipídica de *Chlorella vulgaris.* As células cultivadas a 25ºC de temperatura e 60 μmol de $fótons.m^{-2}s^{-1}$ de intensidade luminosa em ciclo claro e escuro 16:8, foram mantidas em condições autotróficas, utilizando como fonte de carbono orgânico CO_2 ou $NaHCO_3$. Na presença de $NaHCO_3$, a produtividade em lipídios após 5 dias de crescimento variou de 2,7 a $6,3mg.L^{-1}.d^{-1}$, dependendo da composição do meio de cultivo. Quando na presença de ar enriquecido com CO_2 a 2,0% em uma vazão de 0,2vvm, a produtividade variou entre 40,2 e 56,2 $mg.L^{-1}.d^{-1}$. Quando obtida uma produtividade de $56,2mg.L^{-1}.d^{-1}$, o perfil de ácidos graxos foi o seguinte: 5,24% de ácido palmítico; 0,06% de ácido palmitoléico; 2,39% de ácido olênico; 3,31% de ácido oléico; 6,16% de ácido linoléico; 1,18% de ácido linolênico; e 5,5% outros ácidos.

6 - CONCLUSÕES

- O uso da mistura dos solventes orgânicos clorofórmio:metanol (2:1) associado ao uso de ultrassom se mostrou mais eficiente à extração de lipídios totais e TAGs em biomassa de *Chlorella vulgaris*. O uso dessa mistura pode favorecer a extração de lipídios neutros (TAGs) tanto sob a forma livre como sob a forma de complexos. A associação do uso de ultrassom ao uso do solvente favorece o rompimento celular e aumenta o rendimento da extração.

- A máxima produtividade em biomassa foi observada quando foi utilizado uma concentração de 1,21g.L^{-1} de $NaNO_3$; 4,49g.L^{-1} de K_2HPO_4 e inóculo inicial de células igual a DO_{730nm} 0,2. O aumento na concentração de nitrato de sódio favoreceu no desenvolvimento de diversas reações metabólicas associadas ao crescimento celular, assim como o aumento no inóculo inicial reduziu a fase *lag* de crescimento.

- À exceção da produtividade em biomassa, o teor e a produtividade em lipídios, assim como a produtividade em TAGs foram favorecidos pela condição limitante de nitrato no meio extracelular. Ainda que tenha sofrido redução após a etapa de estresse, a produtividade final em biomassa se manteve favorável em relação à produtividade obtida no início do estudo. No presente trabalho foi possível aumentar a produtividade final em biomassa e em lipídios e reduzir o tempo total de cultivo.

7 - BIBLIOGRAFIA

ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biodiesel), 2012a. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1359568985545> Acesso em 30/01/13.

ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biodiesel), 2012b. *Boletim mensal de biodiesel em dezembro de 2012.*

Araujo, G. S.; Matos, L. J. B. L.; Fernandes, J. O.; Cartaxo, S. J. M.; Gonçalves, L. R. B; Fernandes, F. A. N.; Faria, W. R. L. *Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method.* Ultrasonics Sonochemistry, 20, 95-98, 2013.

Ban-Weiss, G. A.; Chen, J. Y.; Buchholz, B. A.; Dibble, R. W. *A numerical investigation into the anomalous slight NOx increase when burning biodiesel; a new (old) theory*. Fuel Processing Technology, v.88, 659-667, 2007.

Becker, E. W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, New York, 1994.

Behrens, P. W. & Kyle, D. J. *Microalgae as a source of fatty acids*. Journal of Food Lipids, 3, 259, 1996.

Bicudo, C. E. M. & Menezes, M. *Gêneros de algas continentais no Brasil*. Editora Rima, 2ª edição, São Carlos, 2006.

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Biochemistry, 37 (8): 911-917, 1959.

Brasil, 2013. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matrizenergetica/biocombustiveis> Acesso em 30/01/2013.

Brennan, L. & Owende, P. *Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.* Renewable and Sustainable Energy, 14, 557-577, 2010.

Brown, M. R.; Mular, M.; Miller, I.; Farmer, C. & Trenerry, C. *The vitamin content of microalgae used in aquaculture*. Journal of Applied Phycology, 11, 247-255, 1999.

Camacho Rubio, F.; García Camacho, F.; Fernández Sevilla, J. M.; Chisti, Y. & Molina Grima, E. *A Mechanistic Model of Photosynthesis in Microalgae.* Biotechnology and Bioengineering, vol. 81, nº 4, 2003.

Cartoni, C. R. *Avaliação de catalisadores alcalinos na produção de biodiesel metílico derivado de óleo de soja: analise técnica, econômica e ambiental*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Paulo. Lorena, 2009.

Chisti, Y. *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, 25, 294, 2007.

Cifuentes, L.; Borja-Aburto, V.H.; Gouveia, N.; Thurston, G.; Davis, D.L. *Hidden Health Benefits of Greenhouse Gas Mitigation*. Science, 293, 1257-1259, 2001.

Conab, 2012. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_10_09_15_59_18_boletim_portugues_outubro_2012.pdf> Acesso em 27/02/13.

Converti, A.; Casazza, A. A.; Ortiz, E. Y.; Perego, P.; Del Borghi, M. *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, 2009.

Cosmética, 2009. Disponível em <http://www.cosmeticaemfoco.com.br/2009/04/emolientes-com-propriedades.html#axzz2M7l7NKX0> Acesso em 27/02/13.

Courchesne, N. M. D; Parisien, A.; Wang, B, & Lan, C. Q. *Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches*. Journal of Biotechnology, 141:31-41, 2009.

Coutinho, P. & Bomtempo, J. V. *Roadmap tecnológico em matérias-primas renováveis: uma base para a construção de políticas e estratégias na Brasil*. Química Nova, v34, n5, 910-916, 2011.

Craigie, J. S. *Cell walls* in: Biology of the red algae. Cambridge University Press, 221-257, 1990.

Duerr, E. O.; Edralin, M. R. & Price, N. M. *Facilities requirements and procedures for the laboratory and outdoor raceway culture of Spirulina spp.* Journal of Marine Biotechnology, 5:1, 11, 1997.

Eberhard, S.; Finazzi, G. & Wollman, F. A. *The Dynamics of Photosynthesis.* Annual Review of Genetics, 42:463-515, 2008.

Ehimen, E. A.; Sun, Z. F. & Carrington, C. G. *Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids*. Fuel, 89:677-84, 2010.

EPE (Empresa de pesquisa energética). Anual estatístico de energia elétrica 2012. Disponível em <http://www.epe.gov.br/AnuarioEstatisticodeEnergiaEletrica/20120914_1.pdf > Acesso em 17/04/13.

Folch, J.; Less, M. & Sloane Stanley, G. H. *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.* The Journal of Biological Chemistry, 26 (1): 497-509, 1957.

Fon Sing, S.; Isdepsky, A.; Borowitzka, M. & Moheimani, N. *Production of biofuels from microalgae*. Mitigation and adaptation strategies for global change, 1-26, 2010.

Franco, A. L. C; Lôbo, I. P; Cruz, R. S.; Teixeira, C. M. L. L.; Neto, J. A. A.; Amado, J. & Menezes, R. S. *Biodiesel de microalgas: avanços e desafios*. Química Nova, 1-12, 2012.

Guil-Guerrero, J. L.; Navarro-Juárez, R.; López-Martínez, J. C.; Campra-Madrid, P. & Rebolloso-Fuentes, M. M. *Functionnal properties of the biomass of three microalgal species*. Journal of Food Engineering, 65, 511-517, 2004.

Guillard, R. R. L. & Lorenzen, C. J. *Yellow-green algae with chlorophyllide*. Journal of Phycology, 8: 10-4, 1972.

Halim, R.; Gladman, B.; Danquah, M. K. & Webley, P. A. *Oil extraction from microalgae for biodiesel production*. Bioresource Technology, 102(1):178-85, 2011.

Halim, R.; Danquah, M. K. & Webley, P. A. *Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review*. Biotechnology Advances, v 30, 709-732, 2012.

Hall, D.O. & Rao, K.K. *Photosynthesis*. Cambridge University Press, 5ª edição, Cambridge, 1994.

Harvey, A. P.; Mackley, M. R. & Seliger, T. *Process intensification of biodiesel production using a continuous oscillatory flow reactor*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology,78:338-41, 2003.

Held, P. & Raymond, K. *Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in Chlorella vulgaris*. Applications Department, BioTek Instruments, 2011.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Guirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances*. The Plant Journal, 54: 621-639, 2008.

Huntley, M. E. & Redalje, D. G. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2006.

IEA (*International Energy Agency*). Key Word Energy Statistics, 2012. Disponível em <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf> Acesso em 31/01/13.

Illman, A. M.; Scragg, A. H.; Shales, S. W. *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium*. Enzyme and Microbial Technology, 27, 631, 2000.

Jaime L.; Mendiola, J. A.; Ibáñez, E.; Martin-Álvarez, P. J.; Cifuentes, A. & Reglero, G. *β-Carotene isomer composition of sub- and supercritical carbon dioxide extracts. Antioxidant activity measurement.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:10585-90, 2007.

Joint Bioenergy Institute. Disponível em <http://www.jbei.org> Acesso em 30/01/2013.

Khalil, C. N. *As tecnologias de produção de biodiesel.* In: O Futuro da Indústria: Biodiesel. Coletânea de artigos. Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior. Brasília, 2006.

Kim, W.; Park, J. M.; Gim, G. H.; Jeong, S.; Kang, C. M.; Jin Kim, D. & Wouk Kim, S. *Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 35:19-27, 2012.

King, L. M.; Liang, X. & Rusch, K. A. *Nutritional Properties of the Marine Rotifer Brachionus plicatilis Fed the Freshwater Microalgae Selenastrum capricornutum*. Journal of the World Aquaculture Society, 33(4), 478-488, 2002.

Lam, M. K. & Lee, K, T. *Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward*. Biotechnology Advances, 30, 673-690, 2012.

Lei Nº 11.097, DE 13.1.2005 - DOU 14.1.2005. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml> Acesso em 30/01/13.

Li, Z.; Yuan, H.; Yang, J. & Li, B. *Optimization of the biomass production of oil algae Chlorella minutissima UTEX2341*. Bioresource Technology 102, 9128–9134, 2011.

Liang, Y.; Sarkany, N. & Cui, Y. *Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions*. Biotechnology Letters, 31:1043-1049, 2009.

Lin, Q.; Gu, N. & Junda, L. *Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a Scenedesmus rubescens-like microalga.* Bioresource Technology, 2012.

Ling Yeh, K. & Shu Chang, J. *Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga Chlorella vulgaris ESP-31*. Bioresource Technology 105, 120–127, 2012.

Liu, Z. Y.; Wang, G. C. & Zhou, B. C. *Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris.* Bioresource Technology 99, 4717–4722, 2008.

Lourenço, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. Editora Rima, Rio de Janeiro, 2006.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parket, J. *Microbiologia de Brock*. Editora Pearson Education do Brasil, 10ª edição, São Paulo, 2007.

Mason, T. J.; Paniwnyk, L. & Lorimer, J. P. *The use of ultrasound in food technology*. Ultrasonics Sonochemistry, 3, S253-S256, 1996.

Mata, T. M.; Martins, A. A. & Caetano, N. S. *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, v14, pp 217-232, 2010.

MEC (Ministério da Educação/Secretaria da Educação Profissional e Tecnológica). Biodiesel. Brasília, 2006. Disponível em <http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/cartilha_biodiesel.pdf> Acesso em 30/01/13.

Mendes, R. L.; Nobre, B. P.; Cardoso, M. T.; Pereira, A. P. & Palavra, A. F. *Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae*. Inorgânica Chimica Acta, 356:328-34, 2003.

Mercer, P. & Amenta, R. E. *Developments in oil extraction from microalgae.* European Journal of Lipid Science and Technology, 113, 539-547, 2011.

Ming Lv, J., Hua Cheng, L., Hua Xu, X., Zhang, L. & Lin Chen, H. *Enhanced lipid production of Chlorella vulgaris by adjustment of cultivation conditions.* Bioresource Technology 101, 6797-6804, 2010.

MME (Ministério Minas e Energia), 2013. Disponível em <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html> Acesso em 30/01/13.

Molina, G. E.; Medina, R. A.; Giménez, G. A. *Recovery of algal PUFAs*. In: Cohen, Z. Chemicals from microalgae, London: Taylor & Francis, 1999.

Montes D'Oca, M. G.; Viêgas, C. V.; Lemões, J. S.; Miyasaki, E. K.; Morón-Villarreyes, J. A.; Primel, E. G. & Abreu, P. C. *Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the Chlorella pyrenoidosa*. Biomass and Bioenergy, 35: 1533-1538, 2011.

Namikoshi, M. *Bioactive compounds produced by cyanobacteria*. The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 17:373-384. 1996.

Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehinger*. Editora Artmed, 2010.

Nutrinova Disponível em <http://www.nutrinova.com.br/> Acesso em 20/02/13.

Ördög, V.; Stirk, W. A.; Bálint, P.; Staden, J. V.; & Lovász, C. *Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed Chlorella minutissima cultures*. Journal of Applied Phycology, 2011.

Ota, M.; Watanabe, H.; Kato, Y.; Watanabe, M.; Sato, Y. & Smith, RL Jr. & Inomata, H. *Carotenoid production from Chlorococcum littorale in photoautotrophic cultures with downstream supercritical fluid processing*. Journal of Separation Science, 32:2327-35, 2009.

Parente, E. J. S. *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Fortaleza, Ceará, 2003.

Pulz, O & Gross, W. *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 65: 635-648, 2004.

Resolução ANP Nº 2, DE 12.1.2011 - DOU 13.1.2011 – Retificada DOU 3.2.2011. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=57271&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1359929570750> Acesso em 03/02/13.

Resolução ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=53930&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1359929659869> Acesso em 03/02/13

Rezende, R. C.; Moreira, D. M.; Aranda, D. A. G. & Teixeira, C. M. L. L. *Chlorella vulgaris for biodiesel production: evaluation of different extraction methods and culture conditions for obtaining total lipids and triacylglycerides.* In: 2nd International on Algal Biomass, Biofuels, & Bioproducts. Westin San Diego, USA, 2012.

Richmond, A. *Handbook of microalgal culture:biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.

Rodrigues, M. I. & Iemma, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*, 229-272. Casa do pão, Rio de Janeiro, 2005.

Rym, B. D., Nejeh, G., Lamia, T., Ali, Y., Rafika, C., Khemissa, G., Jihene, A., Hela, O. & Hatem, B. O. *Modeling growth and photosynthetic response in Arthrospira platensis as function of light intensity and glucose concentration using factorial design*. Journal of Applied Phycology, 22(6), 745-752, 2010.

Sander, K. & Murthy, G. S. *Life cycle analysis of algae biodiesel*. International Journal of Life Cycle Assessment, 15: 704-714, 2010.

Sawangkeaw, R.; Bunyakiat, K. & Ngamprasertsith S. *A review of laboratory-scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol (2001–2009).* Journal of Supercritical Fluids, 55:1-13, 2010.

Sheng, H.; Yin, J.; Gao, Z.; Huang, H.; Ji, X & Dou, C. *Disruption of Chlorella vulgaris Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves.* Applied Biochemistry and Biotechnology , 2011.

Singh A., Nigam P. S. & Murphy J. D. *Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels*. Bioresource Tecnologia, 102:26-34, 2011.

Soares, D. *Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de pós-graduação em Ciências: Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

Song, D.; Fu, J. & Shi, D. *Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel*. Chinese journal of biotechnology, v. 24, p. 341-348, 2008.

Spolaore, P.; Cassan, C. J.; Duran, E.; Isambert, A. *Commercial Applications of Microalgae.* Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 101, nº 2, 87-96, 2006.

Stengel, D. B.; Connan, S. & Popper, Z. A. *Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application*. Biotechnology Advances, 29, 483-501, 2011.

Stephenson, A. L.; Kazamia, E.; Dennis, J. S.; Howe, C. J.; Scott, S. A. & Smith, A. G. *Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors*. Energy Fuel, 24, 4062-77, 2010.

Stolz, P. & Obermayer, B. *Manufacturing microalgae for skin care*. Cosmet. Toiletries, 120: 99-106, 2005.

Taiz, L. & Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. Editora Artmed, 3ª edição, Porto Alegre, 2006

Takagi, M.; Karseno; Yoshida, T. *Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cells.* Journal of Bioscience and Bioengineering. 101 (3), pp 223-226, 2006.

Teixeira, C. M. & Morales, M. E. *Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel*. In: I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel, Brasília, 2006.

Tokuşoglu, Ö. & Ünal, M. K. *Biomass nutrient profiles of three microalgae: Spirulina platensis, Chlorella vulgaris and Isochrisis galbana*. Journal of Food Science, 68:1144-1148, 2003.

Vianni, R. & Braz-Filho, R. *Ácidos Graxos Naturais: Importância e ocorrência em alimentos*. Química Nova, 19(4), 400, 1996.

Viscardi, F. A. P. D. *Análise de viabilidade técnica e econômica do biodiesel no Brasil*. In: 3° Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás, Salvador, 2005.

Westbrook, C. K. *Biofuels Combustion*. Annual Review of Physical Chemistry, 64, 201-219, 2012.

Wikipedia, 2013. Disponível em <http://gl.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Thylakoid_membrane_2_gl.svg> Acesso em 18/02/13.

Yen Chen, C.; Ling Yeh, K.; Aisyah, R.; Jong Lee, D. & Shu Chang, J. *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review*. Bioresource Technology, 120, 71-81, 2011.

Yin-Hu, W.; Yin, Y.; Xin, L.; Hong-Ying, H. & Zhen-Feng, S. *Biomass production of a Scenedesmus sp. under phosphorous-starvation cultivation condition*. Bioresource Technology, 112, 193-198, 2012.

Yon Lee, J.; Yoo, C.; Young Jun, S.; Yong Ahn, C. & Mock Oh, H. *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. Bioresource Technology 101, S75–S77, 2010.

Zheng, Y.; Chi, Z.; Lucker, B. & Chen, S. *Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production*. Bioresource Technology 103, 484-488, 2012.

8 - ANEXO

Meio WC modificado (GUILLARD & LORENZEN, 1972)

Reagente	Concentração
Tampão TRIS	0,5g.L^{-1}
$NaNO_3$	0,085g.L^{-1}
$NaHCO_3$	0,0126g.L^{-1}
$CaCl_2.2H_2O$	0,03676g.L^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,03697g.L^{-1}
K_2HPO_4	0,00871g.L^{-1}
H_3BO_3 1%	1mL.L^{-1}
Solução de vitaminas	1mL.L^{-1}
Solução de metais traços	1mL.L^{-1}
Ph (ajustado com HCl 1M)	8,5

Solução de vitaminas

Reagente	Concentração
Tiamina	0,1g.L^{-1}
Cianocobalamina	0,0005g.L^{-1}
Biotina	0,0005g.L^{-1}
Filtração em membrana de 0,22µm	

Solução de metais traços

Reagente	Quantidade
$CuSO_4.5H_2O$	0,0098g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,022g
$CoCl_2.6H_2O$	0,01g
$MnCl_2.4H_2O$	0,18g
$NaMoO_4.2H_2O$	0,0063g
Ferro Quelado	900mL

Ferro Quelado

Reagente	Quantidade
Na_2EDTA	4,36g
$FeCl_3.6H_2O$	3,15g
Água destilada	900mL

Solventes utilizados para extração de lipídios totais

Solventes	Características
Clorofórmio	Marca TEDIA
	HPLC/ SPECTRO CS 1334-001 Estabilizado com 0,5-1,0% etanol
n- ‘ 95%	Marca TEDIA
	HPLC/ SPECTRO HS 1722-001
Metanol	Marca TEDIA
	HPLC/ SPECTRO MS 1922-001
Etanol	Marca TEDIA
	HPLC/ SPECTRO AS 1131-001

Equipamentos utilizados para rompimento celular

Equipamentos	Características
Potter	Unidade *potter* para trituração com pistilo Modelo TE-099
	Dimensão L= 350 x P= 300 x A= 540mm
	Potência 150W
Ultrassom	Banho ultrassônico Modelo USC 180
	Frequência 40KHZ
	Potência 132W