

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

CONDIÇÕES DE CULTIVO MIXOTRÓFICO DE *Chaetoceros calcitrans* EM MEIO CONTENDO GLICEROL RESIDUAL E RUPTURA CELULAR PARA A EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DANIELA ALMEIDA NOGUEIRA

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT Orientador

RIO GRANDE, RS 2017

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

CONDIÇÕES DE CULTIVO MIXOTRÓFICO DE *Chaetoceros calcitrans* EM MEIO CONTENDO GLICEROL RESIDUAL E RUPTURA CELULAR PARA A EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DANIELA ALMEIDA NOGUEIRA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT Orientador

RIO GRANDE, RS 2017

Ficha catalográfica

N778c Nogueira, Daniela Almeida. Condições de cultivo mixotrófico de Chaetoceros calcitrans em meio contendo glicerol residual e ruptura celular para a extração de lipídios / Daniela Almeida Nogueira. – 2017. 188 f.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017. Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.
1. *Chaetoceros calcitrans* 2. Lipídios 3. Glicerol residual 4. Ruptura celular 5. Ácidos graxos I. Burkert, Carlos André Veiga II. Título.

Catalogação na fonte: Bibliotecária Claudia Maria Gomes da Cunha CRB10/1942

APROVAÇÃO

Tese defendida por Daniela Almeida Nogueira e aprovada em 14 de agosto de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Carles André Veiga Burlet Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG.

Profa. Dra. Caroline Costa Moraes - UNIPAMPA

Suron H. Surork Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte – FURG

Janaine F. Le medeiros Bunkert-FURG

Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto - FURG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocados pessoas maravilhosas no meu caminho, pelo auxílio para enfrentar os obstáculos, por tudo.

Aos meus pais, Nesio e Sonia, pela sólida formação que me foi dada e pelo contínuo apoio em todos esses anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Aos meus irmãos Cesar e Katiane pela força e apoio nos momentos difíceis desta caminhada.

Ao meu companheiro Roger Rochedo pelo apoio, paciência e compreensão.

À Universidade Federal do Rio Grande – FURG, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – pela oportunidade da realização do curso de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Ao meu orientador, André, pela disponibilidade, incentivo e paciência.

À professora Janaína, pelo carinho e preocupação.

Às professoras Susana, Eliana e Michele pelas essenciais sugestões para a melhoria do trabalho, pelo grande apoio, auxílio de metodologias e contribuições fundamentais no decorrer do trabalho.

Aos componentes da banca de arguição, pela disponibilidade e contribuições para a conclusão do trabalho: Prof. Pinto, Prof. Caroline Moraes, Prof. Susan Hartwig e Prof. Janaína Burkert.

Aos Laboratórios de Análise Sensorial e Controle de Qualidade, Controle Ambiental, Engenharia Bioquímica, Operações Unitárias, Microbiologia e Biosseparações e Micotoxinas desta Universidade, pela parceria no empréstimo de equipamentos e materiais para a efetivação do trabalho. Um agradecimento especial aos Técnicos Administrativos em Educação: Lutiane, Roque, Jaques (*in memorian*), Rafael, Ana, pelo carinho, apoio,

disponibilidade e pelo respeito que tem por sua profissão, que é o que faz esta Universidade ser respeitada.

À Estação Marinha de Aquacultura (EMA), pela doação da água marinha necessária para a execução dos cultivos microalgais, nas pessoas do Ricardo e Alessandro.

À Islanda, secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela presteza e disponibilidade sempre que solicitada. Ao grupo de trabalho e amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, pelos momentos de descontração, brincadeiras, agradável companhia e discussões: Renata Trindade, Carina, Belkis, Joana, Joice, Tabita, Bruno, Michele Paludo, Vanessa, Renata Nunes, Adriel.

Aos amigos do Laboratório de Operações Unitárias, pelos momentos de descontração e agradável companhia: Ana Paula, Janaína, Paola, Silvia.

Ao Laboratório de Micotoxinas, em especial a Maristela, pelo auxílio e disposição na determinação do perfil de ácidos graxos.

Um agradecimento especial à Elisane "Lisi", pelo apoio nos momentos difíceis, pelo constante incentivo, pelo carinho e amizade.

As minhas "kuricas" do coração Natália Torres Ribeiro, Juliane Machado da Silveira e Évelin Vidal (Miau), não só pela amizade, por si só muito importante, mas pela fundamental participação na realização deste trabalho, pela paciência, contribuições, o qual sem elas não teria sido possível.

Aos meus estimados Pets "Milu Maria e Fuca".

A todas pessoas que não foram citadas mas que contribuíram de alguma forma, sintam-se agradecidas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa, e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biomassa e conteúdo lipídico de microalgas em diferentes sistemas de cultivo 31
Tabela 2 - Compostos produzidos por micro-organismos cultivados em meio contendo
glicerol como fonte de carbono orgânico
Tabela 3 - Estudos com micro-ondas e ultrassom no tratamento da biomassa microalgal na
extração de lipídios
Tabela 4 - Empresas iniciantes no mercado de comercialização de biodiesel de algas
Tabela 5 - Limites estabelecidos pelos padrões ASTM, EN e ANP para comercialização do
biodiesel

ARTIGO II

Tabela 1 - Valores de propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graz	xos
relacionados ao perfil de ácidos graxos da microalga C. calcitrans	. 99
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos (%) ao longo do cultivo de C. calcitrans em diferen	ites
condições 1	104
Tabela 3 - Valores de propriedades estimadas do biodiesel para as condições 1 e 2 ao longo	do
tempo para a microalga C. calcitrans 1	107

ARTIGO III

Tabela 1 - Sistemas de solventes utilizados na extração de lipídios	126
Tabela 2 - Conteúdo lipídico da microalga C. calcitrans para diferentes métodos	s de ruptura
celular	127
Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos (%) de C. calcitrans para diferentes métodos	s de ruptura
celular	
Tabela 4 - Consumo de energia dos métodos experimentais de ruptura celular da n	nicroalga C.
calcitrans	
Tabela 5 - Conteúdo lipídico (%)* e extratibilidade em diferentes solventes	
Tabela 6- Limites de tolerância para exposição de solventes	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vista global da frústula das diatomáceas. A) simetria cêntrica e B) simetria	penada.
Figura 2 – Frústulas fósseis das diatomáceas.	
Figura 3 – Estrutura do cloroplasto	
Figura 4 – Reações fotoquímicas e químicas da fotossíntese, no cloroplasto	
Figura 5 – Esquema da cadeia transportadora de elétrons e prótons	
Figura 6 – Etapas do ciclo de Calvin.	
Figura 7 – Biossíntese de triacilgliceróis em microalgas	40
Figura 8 – Processo de síntese biológica de ácidos graxos livres	
Figura 9 – Elongação e dessaturação da cadeia de carbono de ácidos graxos.	
Figura 10 – Classificação dos métodos de ruptura celular	
Figura 11 - Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético	

ARTIGO I

Figura 1 - Conteúdo lipídico e concentração de biomassa final de C. calcitrans en	n diferentes
condições de cultivo	75
Figura 2 - Conteúdo lipídico e concentração de biomassa final de C. calcitrans en	n diferentes
concentrações de silicato de sódio.	80
Figura 3 - Conteúdo lipídico e biomassa final de C. calcitrans em diferentes conce	entrações de
nitrato de sódio	

ARTIGO II

Figura 1 - Acúmulo de lipídios e biomassa ao longo do cultivo de C. calcitrans 1	01
Figura 2 - Proporções relativas (% do total de ácidos graxos) de ácidos graxos saturad	os
(AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de	С.
calcitrans para as condições 1 e 2	02

ARTIGO III

Figura 1 - Fluxograma das e	tapas e operações utilizadas	s na extração de lipídios	
Figura 2 - C. calcitrans an	ntes da ruptura (A), após	ruptura por micro-ondas	30 s (B) e
ultrassom 5 min (C). Aumen	to de 400 vezes.		

CAPÍ	TULO I	15
1.	INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1.	OBJETIVO GERAL	21
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
CAPÍ	ΓULO II	23
2.	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1.	MICROALGAS	25
2.2.	FOTOSSÍNTESE	27
2.2.1.	Transporte de elétrons nas reações fotoquímicas	28
2.2.2.	Etapa química - Ciclo de Calvin (Formação dos compostos orgânicos)	29
2.3.	TIPOS DE CULTIVOS	30
2.4.	NUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO	32
2.4.1.	Fontes de carbono	32
2.4.2.	Glicerol	32
2.4.3.	Silicato	35
2.4.4.	Nitrogênio	36
2.5.	FATORES EXTERNOS QUE INFLUENCIAM NOS CULTIVOS MICROALGA	AIS37
2.5.1.	Iluminância e ciclo de fotoperíodo	37
2.5.2.	Temperatura	39
2.6.	BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS E TRIACILGLICERÓIS POR	
MICR	OALGAS	39
2.6.1.	Síntese dos acilgliceróis (triglicerídeos)	40
2.6.2.	Síntese de acetil-CoA	41
2.6.3.	Síntese de ácidos graxos e elongação e dessaturação da cadeja carbônica	
2.7.	MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR	
2.7.1.	Micro-ondas.	
2.7.2.	Ultrassom	
2.8.	PROPRIEDADES FÍSICO-OUÍMICAS DO BIODIESEL	
2.8.1.	Massa específica	
2.8.2.	Viscosidade cinemática a 40°C.	50
283	Índice de iodo	50
284	Número de cetano	51
2.8.5	Poder calorífico ou calor de combustão	51
2.8.6	Estudos relacionados às propriedades físico-químicas do biodiesel a partir de	
microa	algas	52
2.9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52 52
REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52 53
CAPÍ		55 61
ARTI	GOI	63
PROD	OUCÃO DE LIPÍDIOS PELA MICROALGA <i>Chaetoceros calcitrans</i> EM CULTI	05 VO
MIXO	OTRÓFICO: FFEITOS DE PARÂMETROS DE CUI TIVO	63
1	INTRODUCÃO	69
1. 2	MATERIAL E MÉTODOS	0) 70
2. 2.1	MICROALGA	70 70
2.1. 2.2	GLICEROL RESIDUAL	70 70
2.2. 2 3	ÁGUA MARINHA	70 71
2.5. 2∆	PREPARO DO INÓCULO	/ 1 71
∠. ч . 3		ו / רד
5.		12

SUMARIO

2.1	N/ACUT O	70
3.1.		.72
3.2.	CONDIÇÕES DE CULTIVO.	.72
3.3.	OBTENÇAO DA BIOMASSA MICROALGAL	/3
4.	DETERMINAÇÕES ANALITICAS	73
4.1.	CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	73
4.2.	QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO LIPIDICO	73
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1.	INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NO ACÚMULO DE LIPÍDIOS	E
BIOM	ASSA PELA MICROALGA C. calcitrans	75
6.1.1.	Influência da concentração de glicerol residual	75
6.1.2.	Influência da temperatura	77
6.1.3.	Influência dos ciclos de fotoperíodo	78
6.1.4.	Influência da concentração de silicato de sódio	80
6.1.5.	Influência da concentração de nitrato de sódio	82
7.	CONCLUSÃO	84
REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ARTIC	GO II	87
LIPÍD	IOS DE Chaetoceros calcitrans EM CULTIVO MIXOTRÓFICO COM GLICEROL	
RESI	DUAL: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E PREDICÃO DAS PROPRIEDADES	
FÍSIC	O-OUÍMICAS DO BIODIESEL	87
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1	MICROALGA	94
2.2	GLICEROL RESIDUAL	94
2.2.	ÁGUA MARINHA	94
2.3.	PREPARO DO INÓCUI O	94
3	CUI TIVO NOS FOTOBIORREATORES	95
3.1		95
3.1.	CONDIÇÕES DE CUI TIVO	95
3.2.		96
3.3. 3.4	OUANTIEICA CÃO DE LIPÍDIOS	90
2.4. 2.5	$\begin{array}{c} \text{QUANTIFICAÇÃO DE LIFIDIOS} \\ \text{DEDEU DE ÁCIDOS CRAVOS} \end{array}$	07
5.5. 2.6	PENFIL DE ACIDOS UNANOS DO DIODIESEI	97
<i>3</i> .0.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	9/
4.	ANALISE ESTATISTICA	
J.	CINIÉTICA DO ACÚMULO DE LIDÍDIOS E DIOMASSA	
5.1.	CINETICA DO ACUMULO DE LIPIDIOS E BIOMASSA	
5.2.	A DEDICÃO DA GRAZUS	
5.3.	A PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIODIESEL	106
6.		109
REFE	RENCIAS BIBLIOGRAFICAS	109
ARTIC		113
RUPT	URA CELULAR DE Chaetoceros calcitrans POR MICRO-ONDAS E ULTRASSO	M
PARA	EXTRAÇÃO DE LIPIDIOS	113
3.	CULTIVO NOS FOTOBIORREATORES	122
3.1.	INOCULO	22
3.2.	CONDIÇÕES DE CULTIVO	122
4.	RUPTURA CELULAR	22
4.1.	RUPTURA CELULAR QUIMICA	22
4.2.	RUPTURA CELULAR POR MICRO-ONDAS	23

4.3.	RUPTURA CELULAR POR ULTRASSOM	
4.4.	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	
4.5.	CÁLCULO DE CONSUMO DE ENERGIA	
4.6.	EFEITO DA MISTURA DE SOLVENTES	
4.7.	EXTRATIBILIDADE	126
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6.3.	PRÉ-TRATAMENTO COM MICRO-ONDAS E ULTRASSOM	127
6.4.	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	129
6.5.	CONSUMO DE ENERGIA ELÉTRICA	
6.6.	EXTRAÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES	
7.	CONCLUSÃO	
CAP	ÍTULO IV	
CON	ICLUSÃO GERAL	
SUG	ESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	
CAP	ÍTULO V	
REFI	ERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
APÊ	NDICE	

CAPÍTULO I

RESUMO

A microalga Chaetoceros calcitrans, pertencente à classe Bacillariophyceae, tem mostrado potencial para a obtenção de lipídios. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições do cultivo mixotrófico de C. calcitrans utilizando o glicerol residual da síntese do biodiesel como fonte de carbono, visando à maximização do teor de lipídios da biomassa microalgal, e utilizar diferentes métodos de ruptura celular para a recuperação dos lipídios sintetizados pela microalga. Foram estudados os parâmetros temperatura (20, 25 e 30°C), ciclos de fotoperíodo (12C:12E h e 24C:0E h Claro:Escuro), concentração de glicerol residual (0; 3,37; e 5,61 g L¹), silicato de sódio (0,02; 0,08; e 0,14 g L⁻¹) e nitrato de sódio (0,0001; 0,0002; 0,0005; e 0,001 g L⁻¹). Os experimentos foram conduzidos em uma estufa com fotoperíodo, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), aeração constante de 0,2 L min⁻¹ e concentração inicial de biomassa de 0,55 g L⁻¹. Ao término dos cultivos a biomassa foi recuperada por centrifugação e o conteúdo lipídico foi extraído utilizando o método de Bligh e Dyer. Foram seleciondas duas condições cultivo com maior conteúdo lipídico, sendo avaliada a cinética de produção lipídica e realizada a predição das propriedades do biodiesel. O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografía gasosa. Foram testados os tratamentos por micro-ondas e ultrassom em diferentes tempos de exposição para a ruptura celular da biomassa da microalga. Na extração de lipídios foram testados diferentes sistemas de solventes. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukev a 95% de confiança (p≤0,05). A adição de glicerol residual teve impacto positivo no acúmulo de lipídios e na produção de biomassa em ambos os ciclos de fotoperíodo, e a produção de lipídios foi favorecida à temperatura de 30°C. O aumento da concentração de silicato de sódio não influenciou no acúmulo de lipídios. O nitrato de sódio guando utilizado em menores concentrações proporcionou o aumento do conteúdo lipídico em ambos os ciclos de fotoperíodo. O perfil de ácidos graxos apresentou mudanças ao longo do tempo de cultivo, com variações expressivas nos percentuais de ácidos graxos, com ocorrência principalmente dos ácidos palmítico (C16:0), tetradecenoico (C14:1), palmitoleico (C16:1) e γ -linolênico (C18:3n6). Para as rupturas celulares ambos os tratamentos foram eficientes, sendo o ultrassom (5 min) o que proporcionou menor gasto de energia comparado ao micro-ondas (40 s). Com relação ao perfil de ácidos graxos, os dois métodos de ruptura resultaram em uma mudanca no perfil de ácidos graxos, com aumento de 53,6% (micro-ondas) e 50,3% (ultrassom) para os ácidos graxos saturados e de 43,8% e 41,3%, respectivamente, para os ácidos graxos poli-insaturados. Entre os solventes utilizados para a extração de lipídios, os sistemas utilizando Etanol-Clorofórmio-Água (4:4:3,6 v/v) e Metanol-Diclorometano-Água (4:4:3,6 v/v) apresentaram maior extratibilidade, com 90,7% e 89,8%, respectivamente. Apesar do sistema utilizando Etanol-Diclorometano-Água (1:1:2 v/v) resultar em 54,9% de extratibilidade, pode ser considerado em função da diminuição das quantidades de solvente utilizados.

Palavras-chave: C. calcitrans. Glicerol residual. Ácidos graxos. Ruptura celular.

ABSTRACT

Conditions of mixotrophic culture of *Chaetoceros calcitrans* in a medium with crude glycerol and cell rupture for the extraction of lipids

The microalgae *Chaetoceros calcitrans*, belonging to the class *Bacillariophyceae*, has shown potential for obtaining lipids. The aim of this work was to study the conditions of the mixotrophic culture of C. calcitrans using the crude glycerol of the synthesis of the biodiesel as a source of carbon, aiming to maximize the lipid content of the microalgal biomass, and to use different cell disruption methods for the recovery of the lipids synthesized by the microalgae. Parameters such as temperature (20, 25 and 30°C), photoperiod regimes (12L:12D and 24L:0D h Light:Dark), crude glycerol concentration (0, 3.37 and 5.61 g L⁻¹), sodium silicate (0.02, 0.08 and 0.14 g L^{-1}) and sodium nitrate (0.0001, 0.0002, 0.0005 and 0.001 g L⁻¹), were evaluated. The experiments were performed in an incubator with photoperiod with irradiance of 3,000 lx (40.5 µmol m⁻² s⁻¹), constant aeration of 0.2 L min⁻¹ and initial biomass concentration of 0.55 g L^{-1} . At the end of the cultures the biomass was recovered by centrifugation and the lipid content was extracted using the Bligh and Dyer method. Two culture conditions with higher lipid content were established, the lipid kinetics was constructed and the prediction of the biodiesel properties was carried out. The fatty acid profile was determined by gas chromatography. Microwaves and ultrasound treatments at different exposure times were tested for cell disruption of the microalgae biomass. In the extraction of lipids different solvent systems were tested. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test at 95% confidence level ($p \le 0.05$). The addition of crude glycerol had a positive impact on the accumulation of lipids and on the biomass production in both photoperiod regimes, and lipid production was favored at 30°C. The increase in sodium silicate concentration did not influence the accumulation of lipids. Sodium nitrate when used at lower concentrations provided the increase in lipid content in both photoperiod regimes. The fatty acid profile showed changes over time, with significant variations in fatty acid percentage, mainly occurring palmitic (C16:0), tetradecenoic (C14:1), palmitoleic (C16:1) and y-linolenic (C18:3n6) acids. For the cell disruption both treatments were efficient, being the ultrasound (5 min) which provided lower energy expenditure compared to the micro waves (40 s). Regarding the fatty acid profile, the two methods of disruption resulted in a change in the fatty acid profile, with an increase of 53.6% (micro waves) and 50.3% (ultrasound) for the saturated fatty acids, and 43.8% and 41.3%, respectively, for polyunsaturated fatty acids. Among the solvents used for the extraction of lipids, the systems using Ethanol-Chloroform-Water (4:4:3.6 v/v) and Methanol-Dichloromethane-Water (4:4:3.6 v/v) presented 90.7% and 89.8% extractibility, respectively. Despite the system using Ethanol-Dichloromethane-Water (1:1:2 v/v) resulted in 54.9% extractibility, it should be considered as a function of the decrease in the amounts of solvent used.

Keywords: C.calcitrans. Crude glycerol. Fatty acid. Cell disruption.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas vêm ganhando destaque na produção de biomassa e produtos de valor agregado, uma vez que são versáteis e se adaptam a diversas formas de cultivos. Conseguem se desenvolver em diferentes condições climáticas como temperatura, tempo de exposição e intensidade da luz, salinidade do meio de cultivo, entre outros, além de possuírem a capacidade de utilizar diversas fontes de carbono orgânico em cultivos mixotróficos. (HOFFMANN; PEEKEN; LOCHTE, 2008; GAO; YANG; WANG, 2013; BABUSKIN et al., 2014; LIN; WU, 2015; SUBHASH et al., 2014).

O glicerol vem sendo aplicado em cultivos microalgais como fonte de carbono orgânico e pode ser utilizado em substituição à glicose. O glicerol bruto gerado como coproduto da produção do biodiesel, na proporção de cerca de 1 kg de glicerol para 10 kg de biodiesel, constitui uma matéria-prima de baixo valor para cultivos microbianos. Em dados recentes, o Centro de Referência da Cadeia de Produção de Bicombustíveis para a Agricultura Familiar (2017) cota a glicerina com 75% de glicerol em R\$ 400,00/ton contra apenas R\$ 80,00/ton do glicerol bruto. Em função da diferença expressiva nos preços, algumas usinas no Brasil já estão instalando em suas plantas equipamentos para produzir a glicerina bidestilada (99,5% de glicerol), no entanto a maioria das usinas de biodiesel não tem plantas de refino de glicerol, e a demanda das indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos, as principais compradoras, utilizam o glicerol com um teor de pureza elevado. Logo, alternativas para a aplicação do glicerol bruto devem ser propostas, como seu uso em cultivos de microalgas, uma vez que estes micro-organismos possuem a capacidade de assimilá-lo em sua forma não purificada, podendo assim, através de seu metabolismo, produzir produtos de maior valor agregado como, por exemplo, os lipídios (HEREDIA-ARROYO et al., 2011; LIN; WU, 2015).

Em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos desta Universidade, a microalga *Chaetoceros calcitrans*, demonstrou habilidade de metabolizar o glicerol e produzir elevados teores de lipídios, tanto em meio contendo glicerol de grau analítico, produzindo em torno de 44,3% de lipídios (PALUDO, 2012), quanto em meio contendo glicerol residual, produzindo cerca de 40,8% de lipídios (NOGUEIRA, 2013), mostrando assim que o glicerol residual pode ser utilizado no cultivo de *Chaetoceros calcitrans*, proporcionando acúmulo significativo de lipídios e contribuindo para a diminuição de custos com o substrato.

Muitas pesquisas vêm investigando os fatores principais que influenciam a produção de lipídios por microalgas, como as concentrações dos nutrientes do meio de cultivo, entre eles a fonte de carbono orgânico utilizada (HEREDIA-ARROYO et al., 2011), a fonte de nitrogênio (GAO; YANG; WANG, 2013), assim como qual a melhor condição de temperatura (SUBHASH et al., 2014), iluminância e ciclo de fotoperíodo (WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013; BABUSKIN et al.; 2014), visando maior produção de lipídios.

Outro aspecto importante é que, ao longo do tempo de cultivo, há mudanças no perfil de ácidos graxos com relação às proporções dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, podendo assim direcionar a produção da biomassa microalgal para o produto final desejado, seja ele para a indústria alimentícia ou de biocombustíveis (PRATIWI et al., 2009; LEE et al., 2011). Atualmente, há grande interesse na produção de biodiesel a partir de microlgas em função dos elevados preços do petróleo e por questões ambientais (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013). De acordo com o ATMS (American Society for Testing Materials), o biodiesel a partir lipídios de microalgas possui propriedades similares aos estabelecidos pelos padrões de qualidades do biodiesel.

A obtenção da biomassa envolve algumas etapas além do cultivo, sendo que a separação da biomassa do meio de cultura e a extração de lipídios constituem pontos chaves que devem ser considerados, uma vez que requerem operações que agregam custos à produção. Os lipídios são produzidos intracelularmente, sendo, portanto, necessário extraí-los da biomassa. A etapa de extração é favorecida pela aplicação de métodos de ruptura celular, que auxilia na recuperação dos lipídios e podem afetar o perfil de ácidos graxos. Alguns métodos de ruptura celular, como moinho de bolas, choque osmótico (LEE et al., 2010), micro-ondas e ultrassom (LEE et al., 2010; LEE; LEWIS; ASHMAN, 2012; VISWANATHAN et al., 2012;.MA et al., 2014) vêm sendo aplicados com esse propósito.

Por outro lado, os solventes orgânicos geralmente utilizados na extração lipídica possuem alta toxicidade. Um dos principais problemas para a obtenção de lipídios a partir de microalgas é a dificuldade de extraí-los utilizando menores quantidades de solvente. (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015).

Neste contexto, este trabalho vem contribuir com dados relevantes sobre o cultivo de *Chaetoceros calcitrans* utilizando o glicerol residual como alternativa a outras fontes de carbono orgânico, disponibilizando informações sobre condições de cultivo para a produção de lipídios e mudanças no perfil de ácidos graxos. Outro aspecto importante deste trabalho está na utilização de técnicas de ruptura celular que não degradem o lipídio produzido e que facilite a etapa de extração. Além disso, na etapa de extração é importante levar em

consideração os solventes orgânicos utilizados, assim como os respectivos volumes, de forma a diminuir não só custos, mas propor uma alternativa que ocasione menores danos ao ambiente.

1.1. OBJETIVO GERAL

Esta tese tem como objetivo geral estudar as condições do cultivo mixotrófico de *Chaetoceros calcitrans* utilizando o glicerol residual (GR) da síntese do biodiesel como fonte de carbono adicional, visando à maximização do teor de lipídios, bem como utilizar diferentes métodos de ruptura celular e empregar diferentes solventes orgânicos na extração dos lipídios sintetizados pela microalga.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

 Estabelecer as melhores condições de cultivo para a biossíntese de lipídios, como temperatura, ciclo de fotoperíodo, concentração de GR, de silicato de sódio e de nitrato de sódio;

- Avaliar a cinética do acúmulo de lipídios, bem como o perfil de ácidos graxos;

- Predizer, com base na composição em ácidos graxos, as propriedades do biodiesel que pode ser obtido a partir do óleo microalgal produzido;

- Avaliar a ruptura celular utilizando micro-ondas e ondas ultrassônicas na melhor condição para a produção de lipídios,

- Para o melhor método de ruptura celular, testar diferentes solventes na extração de lipídios.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MICROALGAS

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos com dimensão de vários micrômetros (células de diatomáceas variam de 2,0 μ m a 2 mm de diâmetro). Podem se desenvolver em diversos habitats aquáticos, que incluem água doce, salobra (menos de 3,5% de sal), marinha (3,5% de sal), hipersalina (mais de 3,5% de sal) e em ambientes com uma ampla gama de temperatura e pH (LOURENÇO, 2006).

As diatomáceas são um grupo de microalgas pertencentes à classe *Bacillariophyceae*, que tem por característica morfológica principal apresentarem frústulas silicosas (Figuras 1 e 2). São peculiares pelo fato de apresentarem ausência de flagelos e pela parede celular dividida em duas partes que se sobrepõem, denominadas frústulas, que são formadas de sílica opalina polimerizada. A parte superior da parede é chamada epivalva e a inferior hipovalva, sendo a região de interligação conhecida como região pleural.

Figura 1 - Vista global da frústula das diatomáceas. A) simetria cêntrica e B) simetria penada



Fonte: PÍSKOVÁ (2010)

Com base na simetria, reconhecem-se dois tipos de diatomáceas: as penadas, com simetria bilateral; e as cêntricas, com simetria radial. As diatomáceas penadas são encontradas em ambientes de água doce e salgada, ou associadas a sedimentos marinhos ou habitats relativamente rasos, sendo exemplos de diatomáceas penadas *Navicula, Pinnularie Thalassionema*. As diatomáceas cêntricas, pelo fato de possuírem uma relação superfície/volume maior que a das penadas, flutuam com mais facilidade e são mais abundantes em grandes lagos e ambientes marinhos, tendo-se como exemplos *Coscinodiscus, Triceratium* e *Chaetoceros*.



Figura 2 - Frústulas fósseis das diatomáceas

Fonte: PÍSKOVÁ (2010)

Várias espécies apresentam alto valor nutricional e facilidade de cultivo, como *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira fluviatilis*. O valor nutricional das diatomáceas deriva em parte da presença de ácidos graxos poli-insaturados como o ácido eicosapentanóico em altas concentrações. Os plastos apresentam clorofila a e c, β -caroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina como seus principais pigmentos fotossintéticos. Existem várias espécies de microalgas eucarióticas, como as pertencentes à classe das *Chlorophyceae, Xanthophyceae* e *Bacillariophyceae*, conhecidas por serem ricas em lipídios (20% a 50%) e proteínas, e crescerem rapidamente (RICHMOND; HU, 2013).

A espécie *Chaetoceros calcitrans* é uma microalga marinha unicelular, diatomácea de simetria cêntrica, pertencente à classe *Bacillariophyceae*. Uma de suas características é a capacidade de se adaptar rapidamente e crescer em diferentes instalações de cultivo, abertas ou fechadas. Essa microalga vem sendo estudada para a produção de carotenoides como a fucoxantina (FOO et al., 2015). Seraspe et al. (2014) utilizaram *Chaetoceros calcitrans* como suplemento na alimentação de peixes e camarões, por sua atividade antibacteriana. Outros estudos relacionados à microalga foram direcionados à sua capacidade de crescimento em diferentes concentrações de nutrientes como nitrogênio, fósforo e silicato (TANTANASARIT; ENGLANDE; BABEL, 2013). Em outras pesquisas, essa microalga foi utilizada para a obtenção de lipídios e ácidos graxos, como Li et al. (2014),

que estudaram as principais alterações lipídicas de algumas microalgas durante a fase de crescimento. Neste estudo, obtiveram percentual de 49,85% de triacilgliceróis (TAGs) para *C. calcitrans,* apresentando $11,53 \pm 1,22$ nmol mg⁻¹ de ácido eicosapentanóico (EPA). Lee et al. (2011) obtiveram 16,25% de conteúdo lipídico para *C. calcitrans,* dos quais em torno de 300 mg g⁻¹ corresponderam ao ácido palmítico.

2.2. FOTOSSÍNTESE

No processo conhecido como fotossíntese, as plantas, algas e certas bactérias são capazes de utilizar a luz solar como fonte de energia para dirigir a síntese de compostos orgânicos. A fotossíntese aeróbica resulta na liberação de oxigênio molecular e a remoção do dióxido de carbono da atmosfera, que é usado para sintetizar hidratos de carbono. Este processo, que envolve uma série complexa de reações de transferência de elétrons, fornece a energia e carbono reduzido necessário para a sobrevivência de praticamente toda a vida no planeta, bem como o oxigênio molecular necessário para o consumo dos organismos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A fotossíntese retira elétrons com baixa energia da água, energiza esses elétrons usando a luz, em seguida utiliza esses elétrons para produzir ATP e NADPH e em seguida utiliza o ATP e o NADPH para transformar o CO₂ em carbono orgânico (TAIZ; ZEIGER, 2006).



Figura 3 - Estrutura do cloroplasto

O processo de fotossíntese ocorre dentro de uma organela chamada cloroplasto, que é envolvida por duas membranas, uma externa e outra interna. Sua parte interior é

Fonte: Modificado de TAIZ; ZEIGER (2006)

chamada de estroma, que por sua vez possui estruturas achatadas chamadas tilacoides, que quando empilhadas dão origem ao granum (Figura 3).

A fotossíntese pode ser dividida em duas etapas: a etapa clara ou fotoquímica na qual ocorre o aproveitamento da energia da luz; e a etapa escura ou química responsável pela obtenção do gás carbônico para a produção dos compostos orgânicos (Figura 4).

Figura 4 - Reações fotoquímicas e químicas da fotossíntese, no cloroplasto



Fonte: Adaptado de TAIZ; ZEIGER (2006)

2.2.1. Transporte de elétrons nas reações fotoquímicas

A Figura 5 mostra o esquema da cadeia de transporte de elétrons e prótons. A luz excita o elétron no PSII, água é oxidada e os prótons são liberados no lúmen pela PSII. O PSI reduz NADP⁺ para NADPH no estroma, através da ação da ferroxidina (Fd) e da flavoproteína ferredoxina-NADP redutase (FNR). Os prótons também são transportados para o lúmen pela ação do complexo do citocromo B₆f e contribuem para o gradiente eletroquímico de próton. Esses prótons passam pela a enzima ATP sintase e produzem ATP. Com a redução da plastoquinona (PQH₂) e da plastocianina, os elétrons são transferidos para o citocromo b₆ e PSI, respectivamente. As linhas tracejadas representam a transferência de elétrons e as linhas sólidas representam o movimento do próton (TAIZ; ZEIGER, 2006).



Figura 5 - Esquema da cadeia transportadora de elétrons e prótons

Fonte: Adaptado de TAIZ; ZEIGER (2006)

2.2.2. Etapa química - Ciclo de Calvin (Formação dos compostos orgânicos)

Na carboxilação, o ácido fosfoglicérico (PGA) é o primeiro intermediário estável do ciclo de Calvin. A reação descrita acima é catalisada pela enzima ribulose difosfato, conhecida como rubisco (RuDP). Esta enzima é a principal proteína encontrada em folhas verdes, correspondendo a até 40% da proteína total deste órgão. A rubisco, como o próprio nome indica, tem atividade carboxilásica e oxigenásica, embora a afinidade pela carboxilação assegure a ocorrência da fotossíntese mesmo que a concentração de CO₂ seja muito menor que a de O₂, como ocorre normalmente na natureza (Figura 6) (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A fase de redução consiste na utilização do ATP e do NADPH formados durante a fase fotoquímica da fotossíntese para reduzir o ácido fosfoglicérico para produzir o primeiro açúcar, aldeído fosfoglicérico (PGAL), também conhecido como gliceraldeído-3-fosfato. Parte do gliceraldeído-3-fosfato formado é utilizada na regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato e outra parte é utilizada para síntese de amido, sacarose e todos os demais constituintes do vegetal (paredes celulares, membranas, proteínas, organelas, etc.). Na fase de regeneração, as trioses-fosfato (gliceraldeído 3-fosfato) regeneram o aceptor inicial de CO₂ (ribulose difosfato), com gasto de ATP. Este estágio envolve várias interconversões através da ação de isomerases, epimerases, transcetolases, fosfatase e uma quinase (Figura 6) (TAIZ; ZEIGER, 2006).



Figura 6 - Etapas do ciclo de Calvin

Fonte: ARAÚJO (2016)

2.3. TIPOS DE CULTIVOS

As microalgas podem ser cultivadas de forma autotrófica, heterotrófica ou mixotrófica, sendo que a diferença está baseada na fonte de carbono empregada e na utilização de energia luminosa. Nos cultivos autotróficos, o micro-organismo utiliza a energia luminosa para fixar o carbono inorgânico (CO₂) em carbono orgânico através da fotossíntese. Nos cultivos heterotróficos não há o emprego de energia luminosa, porém para suprir a demanda de energia são empregados compostos orgânicos como glicose, acetato e glicerol. E nos cultivos mixotróficos, as microalgas podem se desenvolver tanto autotroficamente quanto heterotroficamente, utilizando ambas as fontes de carbono inorgânico e orgânico, com a microalga realizando a fotossíntese e assimilando o carbono orgânico simultaneamente. Neste tipo de cultivo, a fixação do carbono inorgânico através da fotossíntese é influenciada por condições de iluminação, enquanto que os compostos orgânicos são assimilados através da respiração aeróbia, que é afetada pela disponibilidade de carbono orgânico. Outra característica do cultivo mixotrófico é o fato de envolver luz e fontes de carbono orgânico, enquanto que o heterotrófico não necessita de luz como fonte de energia (LIU et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

Alguns pesquisadores afirmam que a taxa de crescimento específico em cultivo mixotrófico não é a simples combinação do autotrófico e heterotrófico. Os dois processos metabólicos (a fotossíntese para o autotrófico e a respiração aeróbia para o heterotrófico) afetam cada cultivo de forma diversa, o que pode contribuir para efeitos sinérgicos e melhorar

a produtividade em biomassa (CHANDRA et. al., 2014; LIN; WU, 2015). A Tabela 1 mostra dados relativos aos cultivos de diferentes microalgas.

Heredia-Arroyo, Wei e Hu (2010) estudaram os cultivos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico utilizando a microalga *Chlorella protothecoides*, utilizando meio basal modificado, ciclo de fotoperíodo 16C:8E h (Claro:Escuro), a 26°C, verificando que os cultivos heterotrófico e mixotrófico proporcionaram maiores taxas de crescimento celular em relação ao cultivo autotrófico.

Microalga	Biomassa (g L ⁻¹) Conteúdo lipídico (%)			Conteúdo lipídico (%)			Referências
	Autotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Autotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	
Chlorella protothecoides	Aprox. 0,9	Aprox. 4,5	Aprox. 4,5	Aprox. 24	Aprox. 17	Aprox. 25 *	Heredia - Arroyo;Wei; Hu (2010)
Chlorella protothecoides	-	-	2.33 ± 0.93	-	-	17,50 ± 4,98 **	Heredia - Arroyo;Wei; Hu (2010)
Chlorella vulgaris	0,40 ± 0,12	0,75±0,38	1,40 ± 0,10	27,38 ± 22,9	30,58 ± 26,5	13,82 ± 9,91 *	Heredia- Arroyo et al. (2011)
Chlorella vulgaris	-	-	1,17 ± 1,34	-		40,10 ± 22,06**	Heredia- Arroyo et al. (2011)
Phaeodatylum tricornutum	0,46 ± 0,00	-	0,71±0,01	-	-	**	Liu et al. (2009)
Nannochloropsis sp.	Aprox. 0,37	Aprox. 0,38	Aprox. 1,20	Aprox. 28,0	Aprox. 20,0	Aprox. 27,5 *	Cheirsilp; Torpee
Chaetoceros sp.	Aprox. 0,12	Aprox. 0,19	Aprox.0,21	Aprox. 30	Aprox. 22	Aprox. 26 *	(2012)

Tabela 1 - Biomassa e conteúdo lipídico de microalgas em diferentes sistemas de cultivo.

* Glicose como fonte de carbono orgânico

** Glicerol como fonte de carbono orgânico

Zhang et al. (2016) estudaram a influência do cultivo mixotrófico no crescimento da microalga *Ochromonas* sp. frente a diferentes concentrações de glicose. Para tanto, utilizaram três tratamentos: fotoautotrófico, mixotrófico com adição de glicose como fonte de carbono orgânico no início do cultivo e mixotrófico em batelada alimentada (adição de glicose em intervalo de 12 h por 9 dias). Seus resultados demonstraram que a adição de glicose no cultivo mixotrófico e no cultivo mixotrófico com batelada alimentada proporcionaram maior crescimento celular do que no cultivo fotoautotrófico. O cultivo mixotrófico na maior concentração de glicose (150 mg L⁻¹) proporcionou maior crescimento celular comparado a menor concentração de glicose utilizada (50 mg L⁻¹), com aproximadamente 130 x 10^4 células mL⁻¹ e 40 x 10^4 células mL⁻¹, respectivamente. O cultivo mixotrófico com batelada alimentada proporcionou aumento de 10 e 20 vezes no número de

células em comparação ao cultivo mixotrófico, alcançando 1400 x 10^4 células mL⁻¹ (150 mg L⁻¹) e 800 x 10^4 células mL⁻¹ (50 mg L⁻¹), respectivamente.

2.4. NUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO

2.4.1. Fontes de carbono

As microalgas são predominantemente cultivadas fotoautotroficamente, embora algumas cepas possam utilizar carbono orgânico e oxigênio para crescer através de uma via heterotrófica (KIRROLIA et al., 2013). Os cultivos heterotróficos podem atingir altas concentrações de biomassa, reduzindo o custo de produção ao utilizar substratos orgânicos obtidos a partir de águas residuais, resíduos de processamento de alimentos, entre outros. Nos cultivos mixotróficos, a produção de biomassa e outros produtos como lipídios são estimulados, porém isso depende da espécie da microalga e da fonte de carbono utilizada (LIN; WU, 2015).

As fontes de carbono orgânico como a glicose, frutose, sacarose e o glicerol vem sendo bastante exploradas nos cultivos mixotróficos com o intuito de aumentar o crescimento maiores conteúdos lipídicos. Como celular e/ ou produzir os trabalhos de Heredia-Arroyo et al. (2011), que utilizaram a glicose e glicerol; Cerón-García et al. (2013), com glicerol e frutose; e Lin e Wu (2015), com frutose, glicose, sacarose, xilose e glicerol. No entanto, o alto custo da glicose e de outras fontes orgânicas limita a viabilidade comercial nos cultivos microalgais. Portanto, alternativas que proporcionem menores custos são propostas, como obtenção de carbono orgânico através de resíduos industriais como: o melaço (subproduto da indústria de cana-de-açúcar) e o glicerol residual (subproduto da indústria de biodiesel), para a produção de lipídios e ácidos graxos, por Babuskin et al. (2014); vinhaça para produção de biomassa por Ramirez, Farenzena e Trierweiler (2014); e efluentes da indústria de beneficiamento de carnes para produção de biomassa e lipídios (TANGO, 2015).

2.4.2. Glicerol

Como já mencionado, o glicerol vem sendo utilizado em cultivos microbianos como fonte de carbono orgânico. Este é resultado da síntese de biodiesel, e pode ser empregado em diversos setores das indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos, entre outros. É chamado de glicerina o produto comercial com aproximadamente 95% de glicerol (1,2,3-propanotriol), mas atualmente, com o aumento da produção de biodiesel em todo o
mundo, uma fração com cerca de 80% de glicerol é normalmente denominada de glicerina bruta ou glicerol bruto (MOTA, 2011) ou glicerol residual. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), os biocombustíveis são definidos como derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia, sendo os principais produzidos no Brasil o etanol obtido da cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel obtido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais.

O biodiesel é um biocombustível derivado de fontes renováveis, que pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento, a esterificação ou pela transesterificação. Esta última, mais utilizada, consiste numa reação química de óleos vegetais ou de gorduras animais com o álcool comum (etanol) ou o metanol, estimulada por um catalisador. Segundo a ANP, a produção e o uso do biodiesel no Brasil propiciam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social, proporcionando a diminuição da dependência do diesel importado, e o incremento a economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços. O resultado da ampliação do uso do biodiesel é o efeito positivo sobre o meio ambiente, acarretando a diminuição das principais emissões veiculares em comparação ao diesel derivado do petróleo.

Além desses aspectos, na síntese de biodiesel a cada tonelada produzida são gerados 100 kg de glicerol residual. No entanto, a fim de purificá-lo para a comercialização estariam envolvidos custos de energia e produção. Uma opção seria utilizar esse resíduo na sua forma bruta, diminuindo os custos de produção e contribuindo para a sustentabilidade da cadeia de produção do biodiesel. É neste contexto que vários estudos vêm propondo a utilização do glicerol bruto em cultivos de micro-organismos, uma vez que bactérias, leveduras e microalgas possuem a capacidade de metabolizar o glicerol para produzir biomassa e compostos de maior valor agregado como lipídios, ácidos graxos, compostos aromáticos e exopolissacarídeos (Tabela 2).

Heredia-Arroyo, Wei e Hu (2010) cultivaram a microalga *Chlorella* protothecoides 249 em meio contendo somente glicose, somente glicerol e diferentes proporções de glicose e glicerol (80:20%, 60:40%, 40:60% e 20:80%), verificando que a maior concentração de biomassa foi obtida usando 100% de glicose (4.07 ± 0.23 g L⁻¹), sendo que com glicerol foi obtido 2.33 ± 0.93 g L⁻¹. As misturas de glicose e glicerol e somente glicerol não mostraram diferenças significativas entre si na biomassa final. Os autores afirmam que mesmo o glicerol não sendo a fonte preferida de carbono para os microorganismos, este pode ser utilizado como substrato para o crescimento de microalgas, assim como para a produção de lipídios, uma vez que não houve diferenças significativas no conteúdo lipídico entre a glicose, as misturas de glicose e glicerol e o glicerol, obtendo-se $15,66 \pm 5,10\%, 21,29 \pm 0,98\%, 16,47 \pm 2,97, 22,91 \pm 4,11 e 17,50 \pm 4,98\%$, respectivamente. Tabala 2. Compostos produzidos por micro organismos cultivados em meio contendo

Tabela 2 - Compostos produzidos por micro-orga	anismos cultivados em meio contendo
glicerol como fonte de carb	oono orgânico.

Micro-organismo	Compostos produzidos	Referência	
Microalgas			
Chorella sp Y8-1	Lipídios e ácidos graxos	Lin; Wu (2015)	
Chlorella protothecoides 249	Lipídios	Heredia-arroyo, Wei; Hu	
		(2010)	
Leveduras			
Yarrowia lipolytica NRRL YB-423	Lipídios e ácidos graxos	Machado Jr et al. (2015)	
Yarrowia lipolytica NRRL YB-	Proteína	Santos et al. (2013)	
423, Candida utilis NRRL Y-900,			
Candida lipolytica NRRL Y-1095,			
Candida rugosa NRRL Y-95			
Rhodotorula glutinis NRRL YB-	Lipídios e ácidos graxos	Spier; Buffon; Burkert	
252, Lipomyces starkeyi NRRL Y-		(2015)	
11557, Lipomyces lipofer NRRL			
Y-11555, Cryptococcus curvatus			
NRRL Y-1511, Candida			
cylindracea NRRL Y-17506			
Yarrowia lipolítica	Ácidocítrico	Kamzolova et al. (2015)	
Yarrowia lipolítica	Ácidocítrico	Rywińska et al. (2010)	
Bactérias			
Pseudomonas putida S12	Compostos aromáticos	Verhoef et al. (2014)	
	(p-hidroxibenzoato)		
Actinobacillus succinogenes	Ácido succínico	Vlysidis et al. (2011)	
Xanthomonas campestris,	Exopolisacarídeos	Trindade; Munhoz;	
Pseudomonas oleovorans,		Burkert (2015)	
Sphingomonas capsulata,			
Zymomonas mobilis.			

Lin e Wu (2015) utilizaram frutose, glicose, sacarose, xilose e glicerol para avaliar o crescimento e o conteúdo lipídico produzido pela microalga *Chlorella* sp. Y8-1 e verificaram, dentre os substratos testados, que a sacarose proporcionou maior conteúdo lipídico (24%), seguido do glicerol (15%) e da glicose (13%). A microalga não conseguiu assimilar eficientemente a xilose, uma vez que seu crescimento foi muito inferior em relação aos outros açúcares.

2.4.3. Silicato

Os sais de silicatos são importantes no desenvolvimento celular das diatomáceas, para produzir as suas frústulas (HOFFMANN; PEEKEN; LOCHTE, 2008), sendo que diferentes concentrações de sais de silicato interferem na morfologia celular, causando alterações na largura, tamanho e formato da válvula (SHIMADA et al., 2009).

Shimada et al. (2009) estudaram os efeitos de nutrientes sobre a silificação esquelética da diatomácea *Neodenticula seminae*, verificando que o silicato inserido no meio foi incorporado no "esqueleto" da diatomácea, não causando mudanças na morfologia ou na taxa de crescimento celular.

Hoffmann, Peeken e Lochte (2008) estudaram a interação do ferro, do silicato e da iluminância, assim como a colimitação desses elementos em três espécies de diatomáceas: Actinocyclus sp., Chaetoceros dichaetae e Chaetoceros debilis. Verificaram que quando expostas a baixa concentração de ferro, baixa intensidade de luz e alta concentração de silicato (AFe/BL/ASi), ocorreu maior crescimento celular. Além disso, observaram que em baixa concentração de silicato no meio ocorreu o alongamento das células. No entanto, em relação ao volume celular, a absorção de silicato pelas microalgas foi muito semelhante para as três microalgas, independente do tamanho da célula. Com relação às taxas de crescimento, os autores mencionam que espécies pequenas podem ser limitadas mais cedo por baixas concentrações de silicato do que em espécies maiores, em que o crescimento é mais lento. Os maiores crescimentos celulares deram-se em altas concentrações de ferro e silicato. Porém, quando Fe e Si foram colimitados, o crescimento foi novamente maior nas espécies menores, sendo que o número máximo de células foi 36 vezes (C. debilis), 7 vezes (C. dichaeta) e 3 vezes (Actinocyclus) mais baixo sob a colimitação de ferro e silicato, em comparação com as condições de maiores concentrações desses nutrientes. Os dados sugeriram que a extensão do ferro e a colimitação do silicato não depende somente do tamanho da célula e que diferenças entre as espécies testadas nesse trabalho e outras relatadas na literatura sugerem que a influência da colimitação de nutrientes é muito complexa.

2.4.4. Nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos essenciais para o crescimento de microalgas, pois atua no desenvolvimento, reprodução e outras atividades fisiológicas de microalgas. Geralmente, sais de amônia, nitratos e ureia são usados como fontes de nitrogênio, mas suas taxas de absorção e utilização são diferentes. Estudos anteriores têm demonstrado que o estresse causado por nutrientes, como a privação de nitrogênio, fósforo e a suplementação de ferro, resulta na redução do crescimento celular e aumento do conteúdo lipídico em várias espécies de microalgas (CHEN et al., 2011; PRAVEENKUMAR et al., 2012; HUANG et al., 2013; GAO; YANG; WANG, 2013).

As microalgas cultivadas em condições estressantes reduzem a divisão celular e redirecionam o carbono para produzir compostos de armazenamento de energia na forma de polissacarídeos e/ou lipídios, como mecanismo de adaptação à composição do meio de cultivo (DOAN; SIVALOGANATHAN; OBBARD, 2011; PRAVEENKUMAR et al., 2012).

O estresse ligado ao nitrogênio geralmente tem efeitos desproporcionais ao crescimento celular e ao conteúdo lipídico, sendo que em condições de privação ou em baixas concentrações de nitrogênio ocorre o aumento do teor de lipídios e a diminuição do crescimento celular. Porém estudos relatam que esta proporção varia de acordo com a espécie de microalga, uma vez que responde de forma diferente à privação de um determinado nutriente. Gao, Yang e Wang (2013) estudaram a privação de nitrogênio no meio de cultivo das microalgas *Chaetoceros muelleri e Dunaliella salina*, avaliando o efeito no crescimento celular na privação de nitrogênio frente ao meio contendo nitrogênio, no entanto essa diminuição foi mais pronunciada em *C. muelleri*. Para o conteúdo lipídico, ambas as microalgas apresentaram maiores percentuais (46,32% e 54,15% para *C. muellerie e D. salina,* respectivamente) em ausência de nitrogênio.

Huang et al. (2013) estudaram o efeito da suplementação de nitrogênio no crescimento das microalgas *Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata* e *Pavlova viridis*, verificando que o crescimento estava positivamente correlacionado com a concentração de nitrogênio no meio de cultivo. As menores taxas de crescimento foram obtidas na privação de nitrogênio, em contraste com a maior concentração de nitrogênio utilizada (1,76 mmol nitrogênio L⁻¹), em que foram obtidas as maiores taxas de crescimento assim como maiores densidades celulares. No mesmo estudo, os autores verificaram que nos cultivos suplementados com 1,76 mmol nitrogênio L⁻¹, as três espécies (*Tetraselmis*)

subcordiformis, Nannochloropsis oculata e *Pavlova viridis*, respectivamente), exibiram baixo conteúdo lipídico (13,40%, 22,50% e 26,45%, respectivamente). À medida que a concentração de nitrogênio no meio foi diminuindo (0,88; 0,44; 0,22 e 0 mmol nitrogênio L⁻¹) houve aumento significativo no conteúdo lipídico das microalgas, sendo de 29,77%, 35,85% e 32,10%, respectivamente, quando cultivadas com 0,22 mmol nitrogênio L⁻¹.

2.5. FATORES EXTERNOS QUE INFLUENCIAM NOS CULTIVOS MICROALGAIS

2.5.1. Iluminância e ciclo de fotoperíodo

As microalgas através da fotossíntese são capazes de converter a energia luminosa em energia química. Nos cultivos em que luz está envolvida (autotrófico e mixotrófico), é importante levar em consideração a intensidade luminosa ou iluminância, assim como o tempo de exposição a essa intensidade luminosa, conhecido como ciclo de fotoperíodo, pois alterações nestes fatores contribuem para o aumento ou redução da biomassa microalgal, assim como no conteúdo lipídico (CHEIRSILP; TORPEE, 2012; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013; BABUSKIN et al., 2014).

Quando a iluminância é superior ao ponto de saturação pode levar a fotoinibição. A fotoinibição consiste na diminuição da capacidade fotossintética devido aos danos causados pela intensidade luminosa acima da requerida para a realização da fotossíntese. Outra dificuldade encontrada nos cultivos é a fotolimitação, que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam às células que estão mais profundas, sendo que cerca de 80% das células são expostas à escuridão completa durante alguns instantes (CHISTI, 2007; CHEIRSILP; TORPEE, 2012; BABUSKIN et al., 2014).

Segundo Cheirsilp e Torpee (2012), a fotoinibição no crescimento celular com alta iluminância não foi observada no cultivo mixotrófico, enquanto que a mesma ocorreu no cultivo fotoautotrófico. Os autores atribuíram esse fato a alguma ação protetora da glicose, influenciando na intensidade da luz que causou a fotoinibição. Além disso, estudaram o crescimento celular e a produção de lipídios pelas microalgas *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp. em cultivo mixotrófico e avaliaram o efeito da iluminância. Chegaram à conclusão que os níveis ótimos de iluminância para proporcionar aumento na biomassa celular e no acúmulo lipídico são diferentes. O aumento da iluminância melhorou o crescimento celular e reduziu o conteúdo lipídico em ambas as espécies, sendo baixas

iluminâncias (2.000 a 5.000 lx) mais adequadas para o acúmulo de lipídios, e altas iluminâncias (8.000 a 10.000 lx) melhores para o crescimento celular.

Babuskin et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes iluminâncias e ciclos de fotoperíodo em cultivo fotoautotrófico e mixotrófico da microalga *Isochrysis galbana*. Observaram que para os cultivos com iluminação contínua com fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro) e para as iluminâncias de 50, 100 e 150 μ mol m⁻² s⁻¹, foram obtidas menores concentrações de biomassa para as diferentes misturas de carbono orgânico (20:80% melaço:glicose; 20:80% glicerol:glicose e 40:60% melaço:glicose), enquanto que para o conteúdo lipídico as maiores porcentagens foram atingidas em fotoperíodo de 18C:6E h em todas as iluminâncias e misturas de carbono orgânico. Com a maior iluminância, (150 μ mol m⁻² s⁻¹), ocorreu a redução da produtividade da biomassa para os três fotoperíodos testados (12C:12E h; 18C:6E h; 24C:0E h), tendo este comportamento sido atribuído à fotoinibição. A maior biomassa (8,35 g L⁻¹) foi alcançada na iluminância de 100 μ mol m⁻² s⁻¹ com fotoperíodo de 18C:6E h utilizando a mistura de 20:80% melaço: glicose.

Wahidin, Idris e Shaleh (2013) estudaram a influência da iluminância no crescimento e conteúdo lipídico da microalga Nannochloropsis sp. e constataram que para iluminância de 100 umol m⁻² s⁻¹ o crescimento celular foi mais vantajoso do que nas iluminâncias de 50 e 200 umol m⁻² s⁻¹. Os autores avaliaram o efeito dos ciclos de fotoperíodo (12C:12E h; 18C:6E h; 24C:0E h) com as diferentes iluminâncias, e verificaram que para 50 µmol m⁻² s⁻¹ a maior concentração celular ocorreu no ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, com 3.0 x 10⁷ cell mL⁻¹. A redução do fotoperíodo para 18C:6E h e 12C:12E h ocasionou redução para 2,1 x 10⁷ e 1,3 x 10⁷ cell mL⁻¹, respectivamente. Os autores atribuíram esses resultados à fotolimitação, devido à baixa iluminância, no entanto a microalga conseguiu crescer melhor no maior tempo de exposição à luz (24C:0E h) mesmo em baixa iluminância. Para 50 µmol m⁻² s⁻¹, a maior concentração celular foi obtida no fotoperíodo de 18C:6E h (6,5 x 10⁷ cell mL⁻¹) no 8° dia de cultivo, e a mudança para fotoperíodo de 12C:12E h e 24C:0E h reduziu significativamente o crescimento celular. Para a iluminância de 200 µmol m⁻² s⁻¹, foi verificado o intenso estresse causado pela alta iluminância, que ocasionou a diminuição do crescimento celular. O maior crescimento celular se deu no ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, com 4,8 x 10⁷ cell mL⁻¹, e quando foi exposta ao ciclo 24C:0E h a concentração diminuiu para 3.6 x 10⁷ cell mL⁻¹.

2.5.2. Temperatura

A temperatura é um parâmetro importante em cultivos microalgais, ocasiona estresse físico no micro-organismo, desempenhando papel significativo no metabolismo, especificamente na síntese de lipídios (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013). A temperatura influencia fortemente a composição celular de lipídios, a absorção de nutrientes, a fixação de carbono, e as taxas de crescimento. O estresse de temperatura leva a mudanças na viscosidade citoplasmática (SUBHASH et al., 2014).

Vários trabalhos vêm investigando a influência da temperatura na obtenção de proteínas, carboidratos, lipídios e outros compostos a partir de biomassa microalgal. Hemalatha, Karthikeyan e Manimaran (2012) estudaram a influência da temperatura sobre a produção de proteínas e carboidratos obtida por *Chaetoceros simplex*, sendo que maiores valores desses compostos foram obtidos a 25°C. Subhash et al. (2014) estudaram a variação de temperatura (25°C, 30°C e 35°C) em uma cultura mista de microalgas e verificaram que o estresse ocasionado pela temperatura possibilitou o acúmulo lipídico e a produção de carboidratos, sendo maiores teores obtidos com a temperatura de 30°C.

As temperaturas consideradas moderadamente altas (35 a 42°C) podem causar danos diretos ao aparato fotossintético, por provocar mudanças na membrana do tilacoide e alterar as propriedades físico-químicas e, também, a organização funcional dessas estruturas celulares. Já em temperaturas baixas, a capacidade fotossintética pode ser reduzida, a capacidade de recuperação do PSII (Fotossistema II) é diminuída, assim como a degradação e a síntese da proteína D1 nos centros de reação (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

2.6. BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS E TRIACILGLICERÓIS POR MICROALGAS

Sabe-se que tanto o carbono inorgânico (CO₂) como as fontes de carbono orgânico (glicose, acetato, glicerol, etc.) podem ser utilizadas por microalgas para produção de lipídios e síntese de ácidos graxos. A composição e a quantidade de lipídios dependem da espécie de microalga e das condições autotrófica ou heterotrófica de crescimento (PEREIRA et al., 2012). Os lipídios se dividem basicamente em lipídios neutros (ácidos graxos, triacilgliceróis e colesterol) e lipídios polares (fosfolipídios e galactolipídios). (BALASUBRAMANIAN; DOAN; OBBARD, 2013). Os fosfolipídios polares são compostos importantes constituintes da membrana celular, enquanto triacilgliceróis são moléculas

metabólicas de armazenamento comum para muitas microalgas marinhas. Alguns estudos demonstram que lipídios polares são predominantes na fase exponencial de crescimento celular, enquanto que os triacilgliceróis são sintetizados na fase estacionária (LV et al., 2010).

2.6.1. Síntese dos acilgliceróis (triglicerídeos)

As microalgas, assim como outros organismos, são capazes de sintetizar e estocar acilgliceróis como fonte de energia e carbono. Geralmente, a síntese se dá a partir do L- α -fosfoglicerol, oriundo da via glicolítica, e acil-CoA. A transferência de resíduos de acilas se dá a partir da acil-CoA transferase que forma o ácido lisofosfatídico que, através da L-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase, transfere outra acila formando o ácido L- α -fosfatídico (Figura 7). Este composto é a origem dos fosfolipídios ou depois da ação de uma fosfatase e incorporação do terceiro resíduo de acila, através da diacilglicerol aciltransferase, se transforma em triacilglicerol.

Os triacilgliceróis são os mais abundantes em microalgas e sua biossíntese consiste em três etapas principais: síntese de acetil coenzima A (acetil-CoA) no citoplasma; síntese de ácido graxo saturado com 16-18 carbonos e posterior dessaturação e elongação da cadeia de carbonos; e síntese dos triacilgliceróis (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013; LIANG; JIANG, 2013).



Figura 7 - Biossíntese de triacilgliceróis em microalgas

Fonte: PEREIRA et al. (2012)

2.6.2. Síntese de acetil-CoA

As microalgas, através da fotossíntese, utilizam o dióxido de carbono através do ciclo de Calvin. Isto é, microalgas capturam a energia luminosa como fonte de energia e assimilam CO₂ como a fonte de carbono. O CO₂ entra no cloroplasto via ciclo de Calvin para gerar gliceraldeído-3-fosfato (GAP), intermediário chave para a síntese de acetil-CoA nas algas fotossintetizantes. O GAP é retirado do ciclo Calvin e exportado para o citoplasma e direcionado para a síntese de açúcares ou oxidado através da via glicolítica até piruvato, onde pode produzir energia ou servir de substrato para a síntese de compostos como os ácidos graxos (HUANG et al., 2010). O piruvato é convertido em acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase (PDH). Depois de entrar nas mitocôndrias, o piruvato é convertido em acetil-CoA, entretanto a coenzima A, componente da acetil-CoA, não pode atravessar a membrana mitocondrial; somente a porção acetila pode ser transportada para o citosol. Isso acontece na forma de citrato, que é produzido pela condensação do oxalacetato (OAA) e da acetil-CoA. No processo de translocação do citrato da mitocondria para o citosol, onde o citrato é clivado pela ATP-citrato-liase para produzir acetil-CoA e OAA, ocorre quando a concentração mitocondrial de citrato é alta. Isso é observado quando a isocitratodesidrogenase é inibida por grande quantidade de ATP, causando acúmulo de citrato e isocitrato. Portanto, o citrato é reconhecido como sinal de grande energia e como é necessária grande quantidade de ATP para a síntese de ácidos graxos, logo o aumento de ATP e citrato intensificam essa rota metabólica (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

2.6.3. Síntese de ácidos graxos e elongação e dessaturação da cadeia carbônica

A síntese de ácidos graxos saturados se dá de forma semelhante em plantas superiores e em algas, através de duas enzimas, a acetil-CoA carboxilase, que é a enzima regulatória do processo, e o complexo sintase de ácido graxo (SAG) (HUANG et al., 2010).

Em algumas microalgas, as atividades enzimáticas da SAG estão divididas em sete diferentes proteínas (seis enzimas e a proteína carreadora de acilas ou ACP). A síntese de ácidos graxos consiste em adicionar à acetil-COA carbonos de dois em dois na cadeia até formar ácido palmítico com 16 carbonos. Os dois primeiros carbonos são provenientes da acetil-CoA, que é o primeiro composto da síntese e a fonte das outras unidades de dois carbonos provem do malonil-CoA. Isto acontece através da incorporação de novas acetilas em um processo cíclico. Nesta primeira reação, catalisada pela SAG, a acetila se condensa com

malonil-CoA, formando acetoacetil ligado à ACP. Este malonil-CoA é originado a partir da reação entre acetil-CoA e o CO₂, catalisada pela acetil-CoA carboxilase. Os compostos finais são ácidos graxos saturados com16 a 18 carbonos, que se formam através de ciclos da SAG.

A Figura 8 mostra seis etapas do processo de síntese biológica de ácidos graxos livres mostrando algumas atividades enzimáticas, para elongação da cadeia até formar o ácido palmítico (16 carbonos) (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Figura 8 - Processo de síntese biológica de ácidos graxos livres



Fonte: HUANG et al. (2010)

Etapa 1 – Acetil-CoA-ACP-acetiltransacilase (uma molécula de acetato é transferida de acetil-CoA para o grupo – SH da ACP, em seguida este fragmento de dois carbonos é transferido para um sítio temporário, o grupo tiol de um resíduo de cisteína da enzima);

Etapa 2 – Malonil-CoA-ACP-transacilase (a ACP, agora livre, aceita uma unidade de três carbonos malonato da malonil-CoA);

Etapa 3 - 3-cetoacil-ACP-sintase (o grupo malonil perde o HCO₃⁻ originalmente adicionado pela acetil-CoA-carboxilase, facilitando o ataque nucleofílico à ligação tioéster que liga o grupo acetila ao resíduo de cisteína; o resultado é um conjunto de quatro carbonos, unido ao domínio ACP; a perda de energia livre pela descarboxilação favorece a reação);

Etapa 4 - 3-cetoacil-ACP-redutase (o grupo cetona é reduzido a álcool);

Etapa 5 - 3-hidroxiacil-AC-desidratase (uma molécula de água é removida para introduzir uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3);

Etapa 6 - Enoil-AC-redutase (a ligação dupla é reduzida).

O resultado dessas etapas é a produção de um composto de quatro carbonos (butiril), cujos três carbonos terminais, totalmente saturados, permanecem unidos à ACP. Essas seis etapas são repetidas, começando com a transferência da cadeia butiril do ACP para a etapa 1. E esse processo é repetido até o ácido graxo atingir o comprimento de 16 carbonos.

A síntese de ácidos graxos insaturados nas algas acontece da mesma forma que nas plantas, animais, fungos e bactérias. O alongamento da cadeia e posterior dessaturação acontece a partir de ácidos graxos com 18 carbonos (saturados ou não) através de alongases e dessaturases, cujos produtos finais são cadeias com 20 a 22 carbonos, variando de acordo com a espécie de microalga (HUANG et al., 2010; PEREIRA et al., 2012; KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013).





Fonte: Adaptado de BÉLIGON et al. (2016)

A Figura 9 mostra a rota da biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados que tem início com a enzima Δ -12 dessaturase, convertendo o ácido oleico em ácido linoleico (LA), em seguida a enzima Δ -15 dessaturase converte o ácido linoleico em ácido α -linolênico (ALA). A partir de ALA, a Δ -6 dessaturase insere uma ligação dupla para produzir o intermediário C18:4 (6,9,12,15), que é alongado para formar a molécula C20:4 (8, 11, 14, 17). Uma segunda dessaturação mediada pela Δ -5 dessaturase leva à síntese do ácido eicosapentaenóico (EPA), que é finalmente alongado e dessaturado pela Δ -4 dessaturase, permitindo a produção final do ácido docosa-hexaenoico (DHA). LA é o precursor da série ômega-6. O primeiro LA é dessaturado pela Δ -6 dessaturase para a produção do ácido gamalinolênico (GLA). O GLA é então alongado e dessaturado pela ∆-5 dessaturase para formar o ácido araquidônico (ARA). O ARA pode ser alongado também e uma etapa de dessaturação mediada pela Δ -4 dessaturase para produzir ácido docosapentaenóico (DPA) (BÉLIGON et al., 2016).

2.7. MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR

A crescente demanda por produtos intracelulares, como lipídios e ácidos graxos, pelas indústrias alimentícias e de biocombustíveis, tem evidenciado a importância dos processos de ruptura celular. Porém, ao selecionar a técnica de ruptura celular devem ser considerados alguns fatores como: tamanho da célula, tolerância a tensões de cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, tempo de operação, rendimento do processo, gasto de energia, custo e capital de investimento (CRAVOTTO et al., 2008; LEE; LEWIS; ASHMAN, 2012; MA et al., 2014).

As microalgas podem ser utilizadas para a produção de um grande número de compostos bioativos de alto valor agregado. A produção comercial de metabólitos intracelulares de microalgas requer as seguintes etapas: (1) a produção em larga escala de biomassa da microalga apropriada; (2) recuperação da biomassa a partir de um cultivo relativamente diluído; (3) extração do metabólito a partir da biomassa; e (4) purificação do extrato bruto (GUDE et al., 2013).

Vários métodos são usados para a extração de lipídios de espécies de microalgas como maceração, extração em contracorrente, extração em líquido pressurizado, extração Soxhlet e extração a frio utilizando clorofórmio e metanol. Estas metodologias são reproduzíveis e permitem a extração rápida desses compostos. Contudo, as microalgas têm estruturas de parede celulares diferentes que dificultam a extração efetiva. No entanto, para

proporcionar maiores eficiências de extração lipídica, é interessante associar, como parte deste processo, métodos eficazes de ruptura da parede celular (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015).

Os métodos de ruptura celular podem ser divididos em quatro categorias, ou seja, mecânicos, físicos, químicos e enzimáticos (Figura 10). Estes métodos podem ser aplicados individualmente ou em várias combinações. No entanto, dependendo da aplicação do produto final, como no caso dos lipídios extraídos de microalgas, que podem ser utilizados para alimentação humana ou na produção de biodiesel, faz-se necessário levar em consideração parâmetros como a resistência da parede das células, economia do processo, a facilidade de scale-up e a extensão da contaminação do produto lipídico (MA et al., 2014).

Araujo et al. (2013) atribuíram a maior capacidade de extração do método de Bligh e Dyer assistido por ultrassom devido à ruptura da parede celular fornecida pelo mecanismo de cavitação, liberando os lipídios para o meio, aliado à alta seletividade dos lipídios contidos nas microalgas em relação ao sistema clorofórmio-metanol-água, que possui caráter polar.



Figura 10 - Classificação dos métodos de ruptura celular

Fonte: Adaptado de LEE; LEWIS; ASHMAN (2012)

Segundo Cravotto et al. (2008), a aplicação de técnicas assistidas por ultrassom e micro-ondas na extração de lipídios economizam tempo, volume de solvente, possuem elevada eficiência de extração e baixo impacto ambiental, uma vez que o método convencional por Soxhlet geralmente tem duração de horas, enquanto que com micro-ondas leva-se apenas alguns minutos e utiliza-se (no máximo) 10 vezes menos solvente.

Ma et al. (2014) explicam que ao romper as células em fragmentos menores através dos pré-tratamentos por micro-ondas e ultrassom, ocorre aumento da área superficial, promovendo maior interação entre partículas celulares e as ondas ultrassônicas ou microondas. Este fato, aliado ao tempo de exposição aos tratamentos, leva ao aumento da taxa de extração lipídica.

No entanto, na obtenção dos lipídios de microalgas, como já mencionado, existe a necessidade de romper a parede celular do micro-organismo, visto que estes são produzidos intracelularmente. Um aspecto importante a ser considerado é encontrar técnicas eficientes que consigam ser aplicadas de maneira mais econômica possível e evitando o uso de grandes quantidades de solvente. Neste contexto, as técnicas de ruptura celular utilizando micro-ondas e ultrassom foram escolhidas para serem aplicadas na ruptura celular de *C. calcitrans* visando à extração de lipídios, considerando que apresentam vantagens como a fácil aplicação, os menores tempos execução, as maiores taxas de extração, a menor quantidade de solventes utilizados e a manutenção da qualidade dos extratos (LEE et al., 2010; LEE; LEWIS; ASHMAN, 2012; MA et al., 2014).

2.7.1. Micro-ondas

A química reforçada por micro-ondas baseia-se na eficiência de aquecimento de materiais por aquecimento dielétrico de micro-ondas. Esse fenômeno depende da capacidade de um material específico (solvente ou reagente) para absorver energia e convertê-lo em calor. As micro-ondas não fornecem calor, o que ocorre é que, por meio do processo de ressonância, as moléculas de água presentes na amostra absorvem as ondas eletromagnéticas. A absorção de energia pelas partículas faz com que elas se agitem e se friccionem, produzindo calor. (KAPPE, 2004). As micro-ondas constituem radiação eletromagnética não ionizante, que possui frequência que varia de 300 a 300.000 MHz e que corresponde a comprimentos de ondas de 1 mm a 1 m. A região de micro-ondas situa-se entre a região de infravermelho e das ondas de rádio no espectro eletromagnético (Figura 11). A maioria dos experimentos de química de micro-ondas relatados é conduzida a 2450 MHz (LEE et al., 2010; MA et al., 2014). Uma razão é que perto dessa frequência, a absorção de energia de micro-ondas pela água líquida é máxima. A interação de materiais dielétricos com micro-ondas leva ao que é geralmente descrito como aquecimento dielétrico devido a uma polarização líquida da substância.



Figura 11 - Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético

Fonte: SANSEVERINO (2002)

O componente elétrico de um campo eletromagnético provoca aquecimento por dois mecanismos principais: polarização dipolar e condução iônica. A irradiação na amostra em frequências de micro-ondas resulta nos dipolos ou íons alinhando-se no campo elétrico aplicado. À medida que o campo do dipolo ou do íon tenta realinhar-se com o campo elétrico alternado, a energia absorvida é dissipada na forma de calor por fricção molecular e perda dielétrica. A quantidade de calor gerada por este processo é diretamente relacionada à capacidade da matriz de se alinhar à frequência do campo aplicado. A princípio, quanto maior for o dipolo, mais intensa deve ser a orientação molecular sob a ação do campo elétrico (GUDE et al., 2013).

Na técnica de micro-ondas, as células são rompidas devido à sua exposição a ondas de alta frequência que provocam movimentação das moléculas pela migração dos íons. A extração assistida por micro-ondas consiste em aquecimento no extrator (principalmente solventes orgânicos líquidos) em contato com a amostra e com a energia de micro-ondas. Ao contrário do aquecimento clássico, as micro-ondas aquecem toda amostra simultaneamente, sem aquecer o recipiente. Portanto, a solução atinge o seu ponto de ebulição muito rapidamente, levando a tempos de extração muito curtos (CAMEL, 2000).

2.7.2. Ultrassom

O ultrassom é transmitido através de qualquer substância, sólido, líquido ou gás, que possua propriedades elásticas. O movimento de um corpo vibratório (a fonte sonora) é comunicado às moléculas do meio, que transmitem o movimento a uma molécula adjacente antes de retornar à sua posição original. Em líquidos e gases, a oscilação das partículas ocorre na direção da onda e produz ondas longitudinais. Por possuírem elasticidade ao cisalhamento, os sólidos também podem resistir a tensões tangenciais e produzir ondas transversais, onde as partículas se movem normalmente para a direção da onda. A ação provoca uma perturbação que percorre o comprimento inteiro por expansão e compressão. Em um líquido, o ciclo de expansão produz pressão negativa que repele uma molécula da outra. Se a intensidade das ondas ultrassônicas for alta o suficiente, o ciclo de expansão pode criar bolhas ou cavidades no líquido. O processo pelo qual as bolhas se formam, crescem e sofrem colapso implosivo é conhecido como cavitação (CASTRO; CAPOTE, 2007).

Tabela 3 - Estudos com micro-ondas e ultrassom no tratamento da biomassa microalgal na
extração de lipídios.

Microalgas	Microalgas Tratamentos	
<i>Botryococcus</i> sp., <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.	Micro-ondas e ultrassom	Lee et al. (2010)
<i>Chlorella</i> sp.	Micro-ondas e ultrassom	Ma et al. (2014)
Botryococcus spp.	Ultrassom	Yeesang; Cheirsilp (2011)
Chlorella minutissima, Chlamydomonas globosa, Scenedesmus bijuga	Ultrassom	Viswanathan et al. (2012)
Chlorella. vulgaris	Ultrassom	Araújo et al. (2013)
Chaetoceros muelleri, Dunaliella salina	Ultrassom	Gao; Yang; Wang (2013)
Mix de microalgas	Ultrassom	Chandra et al. (2014)
Chlorella sp. Y8-1	Ultrassom	Li; Wu (2015)
Eustigmatophyt, Nannochloropsis sp.	Micro-ondas	Wahidin; Idris; Shaleh (2013)
Ankistrodesmus falcatus Kj671624	Micro-ondas	Singh et al. (2015)

Segundo Cravoto et al. (2008), o rompimento celular por ultrassom ocorre quando ondas sonoras, com frequência da ordem de 20 kHz, são convertidas em vibrações em um meio liquido e causam o fenômeno de cavitação. Essas vibrações formam bolhas muito pequenas que entram em colapso, gerando ondas de choque que circulam pelo meio líquido e resultam em impacto e aumento da tensão de cisalhamento, com consequente rompimento da parede celular, permitindo a liberação de lipídios.

2.8. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIODIESEL

A utilização de algas para a produção de biocombustível vem atraindo interesse de centros comerciais, laboratórios e institutos de pesquisa, que passaram a desenvolver novas

tecnologias. A Tabela 4 mostra algumas empresas internacionais que comercializam o biodiesel de algas.

Empresa	Local	Referência
Algenol Biofuels	Florida, EUA	www.algenolbiofuels.com
Aquaflow	Nelson, Nova Zelândia	www.aquaflowgroup.com
Bioalgene	Seattle, EUA	www.bioalgene .com
Origin Oil. Inc	Los Angeles, EUA	www.originoil.com
Seambiotic Ltd.	Tel Aviv, Israel	www.seambiotic.com
Bodega Algae LLC	Boston, EUA	www.bodegaalgae.com

Tabela 4 - Empresas iniciantes no mercado de comercialização de biodiesel de algas.

Fonte: Modificado de CHISTI (2013)

Os padrões de qualidade do biodiesel visam estabelecer parâmetros que fixam os teores limites dos contaminantes que não venham prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio. Devem ser monitoradas também possíveis degradações do produto durante o processo de estocagem. Atualmente o padrão de qualidade americano, elaborado pela ASTM (*American Society of Testing and Materials*), através da norma ASTM D6751, e o estabelecido na União Europeia, através da norma EN 14214 do Comitê Europeu de Normalização (*Comité Européen de Normalisation* - CEN), figuram como os mais conhecidos e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões (Tabela 5).

 Tabela 5 - Limites estabelecidos pelos padrões ASTM, EN e ANP para comercialização do biodiesel.

Norma	ρ (kg m ⁻³)	$\tau (mm^2 s^{-1})$	ΔH (MJ kg ⁻¹)	CN	Índice de iodo (g I ₂ 100 g ⁻¹)
ASTM D6751		1,6-6,0		Min 47	
EM 14213	860 - 900	3,5-5,0	Min 35		Max 130
EM 14214	860 - 900	3,5-5,0		Min 51	Max 120
ANP 255/2003				Min 45	

p:massa específica; U: viscosidade cinemática; \DH calor de combustão; CN número de cetano

Fonte: Adaptado de Duarte; Maugeri (2014)

2.8.1. Massa específica

A massa específica do biodiesel está diretamente ligada com a estrutura das suas moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica dos alquil ésteres, maior será a massa específica. No entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula. A presença de impurezas também poderá influenciar na massa específica do biodiesel como, por exemplo, o álcool ou substâncias adulterantes (LÔBO; FERREIRA, 2009).

2.8.2. Viscosidade cinemática a 40°C

A viscosidade do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação, tem influência no processo de queima na câmara de combustão do motor (KNOTHE, 2005). Alta viscosidade ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel, devido à diminuição da eficiência de atomização na câmara de combustão, ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor. Os sabões residuais, bem como os acilgliceróis não reagidos (mono, di e triacilgliceróis) e os produtos da degradação oxidativa do biodiesel, aumentam a viscosidade do biodiesel. Estes contaminantes podem, portanto, ser monitorados indiretamente através da determinação da viscosidade cinemática a 40°C, que expressa a resistência oferecida pelo biodiesel ao escoamento. Seu controle visa garantir um funcionamento adequado dos sistemas de injeção e bombas de combustível, além de preservar as características de lubricidade do biodiesel (LÔBO; FERREIRA, 2009). A norma EN 14214 (método analítico EN ISO 3104) estabelece um intervalo aceitável de viscosidade de 3,5 a 5,0 mm² s⁻¹, enquanto a norma ASTM D 6751 (método analítico D 445) permite um intervalo um pouco mais amplo, de 1,6 a 6,0 mm² s⁻¹.

2.8.3. Índice de iodo

O número de insaturações não tem apenas efeito nos valores de densidade e de viscosidade do biodiesel, mas também é de grande importância na sua estabilidade oxidativa (FRANCISCO et al., 2010). Através da determinação do índice de iodo, conforme o método analítico da Norma Europeia (EN ISO 1411), é possível determinar o número de insaturações. O método baseia-se no tratamento da amostra com halogênios em excesso, que se adicionarão às duplas ligações. Os halogênios não reagidos são então titulados como tiossulfato de sódio e o resultado expresso como gramas de iodo que reagem com as insaturações em 100 g de amostra. O valor máximo aceito na norma EN 14214 é de 120 g I₂ 100 g⁻¹, e para a EN 14213 é de 130 g I₂ 100 g⁻¹.

2.8.4. Número de cetano

O número de cetano é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores de ciclo diesel, refletindo a qualidade da ignição do combustível. Quanto maior o número de cetano mais curto será o tempo de ignição, sendo que de acordo com Wadumesthrige et al. (2008) o número de cetano apresenta relação inversa ao retardo da ignição. O número de cetano aumenta com o comprimento da cadeia carbônica não ramificada. Desta forma, o hexadecano (cetano) é estabelecido como padrão de valor 100 na escala de cetano, enquanto que para o 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano é atribuído o valor 15. (LÔBO; FERREIRA, 2009).

Comparado com o diesel fóssil, o biodiesel apresenta maiores valores de número de cetano. Na Europa, tanto para o diesel como para o biodiesel, o número de cetano mínimo aceitável é fixado em 51 (método EN ISO 5165). No padrão de qualidade americano, o número de cetano para o diesel é 40, enquanto que para o biodiesel é estabelecido 47 (método D 613) (LÔBO; FERREIRA, 2009; WADUMESTHRIGE et al., 2008;). Na norma brasileira não há um valor mínimo estabelecido de número de cetano para o biodiesel, sendo solicitado o registro do valor medido.

2.8.5. Poder calorífico ou calor de combustão

O poder calorífico determina a quantidade de energia que está disponível no combustível e que é liberada na câmara de combustão, mediante reação química. Quanto maior o poder calorífico maior é a energia do combustível. O poder calorífico divide-se em poder calorífico inferior (PCI) e poder calorífico superior (PCS). A água formada no PCI encontra-se em forma de vapor, enquanto que no PCS, a água encontra-se na fase líquida. A diferença em valores entre os dois resume-se à quantidade de calor necessária para evaporar a água contida nos gases de exaustão. Tanto o PCS quanto o PCI são obtidos mediante calorimetria. Ao se comparar o poder calorífico do diesel mineral com o do biodiesel, quanto menor for o poder calorífico do combustível maior será seu consumo para liberar a mesma energia. Esses cálculos são importantes para determinar o consumo previsto do biodiesel (ZUNIGA et al., 2011).

2.8.6. Estudos relacionados às propriedades físico-químicas do biodiesel a partir de microalgas

Francisco et al. (2010) avaliaram as microalgas *Aphanothece microscopica Nageli, Chlorella vulgaris, Dunaliella tertiolecta, Phaeodactylum tricornutum, Phormidium* sp. e *Scenedesmus obliquus* como matéria-prima para a produção de biodiesel. Dentre os parâmetros de qualidade dos biocombustíveis estudados estavam índice de saponificação, grau de insaturações, número de cetanos, índice de iodo, entre outros, assim como determinaram o perfil de ácidos graxos. Dentre as microalgas estudadas, *Chlorella vulgaris* foi a microalga com maior potencial, produzindo biodiesel com as seguintes características de qualidade: número de cetano de 56,7, índice de iodo de 65,0 g I₂ 100 g⁻¹, grau de insaturação de 74,1%. Todos esses parâmetros encontraram-se dentro dos limites estabelecidos pelo padrão dos EUA (ASTM 6751), padrão europeu (EN 14214) e Norma da Agência Nacional do Petróleo Brasileiro (ANP 255).

Indhumathi, Shabudeen e Shoba (2014) calcularam os parâmetros de qualidade do biodiesel para a microalga *Chlorella vulgaris* e encontraram valores para número de cetano de 44, viscosidade cinemática de 9,1 mm² s⁻¹, ponto de fulgor de 81°C e densidade de 860 kg m³.

2.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das informações expostas na revisão bibliográfica, é importante colocar que são poucos os trabalhos que investigam a microalga *C. calcitrans* para a produção de lipídios. Muitos estudos relatam como características das diatomáceas estas possuírem a parede celular impregnada de sílica, porém não há na literatura estudos específicos avaliando a influência do silicato de sódio no crescimento celular e acúmulo de lipídios por este micro-organismo.

No geral, o que se percebe nas diversas pesquisas sobre microalgas é que diferentes espécies possuem diferentes requerimentos nutricionais para produção de determinado metabólito, como lipídios, por exemplo, sendo que o presente trabalho apresenta uma gama de informações que pode auxiliar na produção de lipídios pela microalga *C. calcitrans*.

É relevante, portanto, destacar a importante contribuição deste trabalho, com relação às diversas condições de cultivo testadas para *C. calcitrans*, como diferentes concentrações de glicerol residual, silicato de sódio, nitrato de sódio, temperatura e ciclos de

fotoperíodo, com o objetivo de estabelecer qual condição de cultivo que proporciona maior acúmulo lipídico. Além disso, este trabalho proporciona o conhecimento de como ocorre esse acúmulo lipídico ao longo do tempo de cultivo, mostrando informações pertinentes às mudanças ocorridas no perfil de ácidos graxos, não só em termos de proporções, mas também, com relação a maior produção de um determinado grupo de ácidos gaxos em dado tempo de cultivo, aspectos ainda pouco explorados na literatura, para microalgas em particular.

Outro ponto importante deste estudo é com relação às predições das propriedades do biodiesel, uma vez que apenas com dados relativos ao perfil de ácidos graxos é possível fazer considerações a respeito da qualidade do biodiesel a ser produzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETR[OLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: http://www.anp.gov.br. Acesso em: 22 de jul. 2016, 10:54:07.

ARAÚJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. L. R. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 95 -98, 2013.

ARAÚJO, J. L. **Fotossíntese.** Slide Share, 2016. Disponível em: https://www.slideshare.net/JosLeandroAraujo/fisiologia-vegetal-e-ecofisiologia-fotossintese. Acesso em: 20 de fev. 2017, 14:40:20.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 463 - 472, 2009.

BABUSKIN, S.; RADHAKRISHNAN, K.; BABU, P. A, S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1653 – 1660, 2014.

BALASUBRAMANIAN, R. K.; DOAN, T. T. Y.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215 - 216, p. 929 - 936, 2013.

BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p. 45 - 62, 2015.

BÉLIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 35 - 42, 2016.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 229 - 248, 2000.

CASTRO, M. D. Q.; CAPOTE, F. P. Techniques and instrumentation in analytical chemistry.1 ed. Córdoba: ELSEVIER, 2007. 398 p.

CERÓN-GARCÍA, M. C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; CONTRERAS-GÓMEZ, A.; MOLINA-GRIMA, E. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semicontinuous modes. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 569 - 576, 2013.

CHANDRA, R.; ROHIT, M. V.; SWAMY,Y. V.; MOHAN, S. V. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 279 - 287, 2014.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada.** 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006. 544 p.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v 110, p. 510 - 516, 2012.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1649 - 1655, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, v. 25, p. 294 - 306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. Journal of Biotechnology, v. 167, p. 201 - 214, 2013.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M., CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898 -902, 2008.

CREFEBIO – **Centro de Referência da Cadeia de Produção de Biocombustíveis para a Agricultura Familiar.** Oferta de glicerina e produção de biodiesel. Disponível em: http://biomercado.com.br/not_detalhe.php?noticia=1248 09/03/2015. Acesso em: 10 de jun. 2017, 17:10: 40.

DOAN, T. T. Y.; SIVALOGANATHAN, B.; OBBARD, J. P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2534 - 2544, 2011.

DUARTE, S. H.; MAUGERI, F. Prediction of quality properties for biodiesel production by oleaginous yeast cultivated in pure and raw glycerol. **Chemical Engineering Transactions**, v.37, p.463 - 468, 2014.

FOO, S. C.; YUSOFF, F. M.; ISMAIL.M.; BASRI. M.; CHAN. K. W.; KHONG, N. M. H.; YAU, S. K. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. **Algal Research**, v. 12, p. 26 - 32, 2015.

FRANCISCO, E. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484 - 491, 2013.

GUDE, V. G.; PATIL, P.; MARTINEZ-GUERRA, E.; DENG, S.; NIRMALAKHANDAN, N. Microwave energy potential for biodiesel production. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 5, p. 1 - 31, 2013.

HEMALATHA, A.; KARTHIKEYAN, P.; MANIMARAN, K. Effect of temperature on the growth of marine diatom, *Chaetoceros simplex* (Ostenfeld, 1901) with different nitrate: Silicate concentrations. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, p. S1817 - S1821, 2012.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245 - 2253, 2011.

HOFFMANN, L. J.; PEEKEN, I.; LOCHTE, K. Iron, silicate, and light co-limitation of three Southern Ocean diatom species. **Polar Biology**, v. 31, p. 1067 - 1080, 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38 - 46, 2010.

HUANG, X.; HUANG, Z.; WEN, W.; YAN, J. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium of the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). Journal Applied Phycology, v.25, p. 129 - 137, 2013.

INDHUMATHI, P.; SHABUDEEN, P. S.; SHOBA, U. S.A method for production and characterization of biodiesel from green microalgae. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v.6, n. 5, p. 111 - 122, 2014.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, p. 4607 - 4638, 2013.

JUNYING, Z.; JUNFENG, R.; BAONING, Z. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, p. 80 - 100, 2013.

KAMZOLOVA, S. V.; VINOKUROVA, N. G.; LUNINA, J. N.; ZELENKOVA, N. F.; MORGUNOV, I. G. Production of technical-grade sodium citrate from glycerol containing biodiesel waste by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 250 - 255, 2015.

KAPPE, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. Angewandte Chemie International Edition, v. 43, p. 6250 - 6284, 2004.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research e development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642 - 656, 2013.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059 - 1070, 2005.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89 - 101, 2012.

LEE, J.; YOO,C.; JUN, S.; AHN, C.; OH, H. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75 - S77, 2010.

LEE, S.; GO, S.; JEONG, G.; KIM, S. Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 16, p. 561 - 566, 2011.

LI, S.; XU, J.; CHEN, J.; CHEN, J.; ZHOU, C.; YAN, X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. **Aquaculture**, v. 428, p. 104 - 110, 2014.

LIANG, M.; JIANG, J. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 395 – 408, 2013.

LIN, T.; WU, J. Effect of sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 100 - 107, 2015.

LIU, X.; DUAN,S.; LI, A.; XU, N.; CAI, Z.; HU, Z. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis and respiration of *Phaeodatylum tricornutum*. Journal of Applied **Phycology**, v. 21, p. 239 - 246, 2009.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596 -1608, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas princípios e aplicaçõe**s. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

LV, X.; ZOU, L.; SUN, B.; WANG, J.; SUN, M. Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 391, p. 73 - 83, 2010.

MA, Y.; CHENG, Y. M.; HUANG, J.; JEN, J.; HUANG, Y.; YU, C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1543 - 1549, 2014.

MACHADO JR, F. R. S.; MICHELON, M.; DALCANTON, F.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F.; BURKERT, C. A. V. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1253 - 1260, 2015.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da produção de biodiesel. **Revista** Virtual de Química, v. 3, n. 5, p. 416 - 425, 2011.

NOGUEIRA, D. A. **Cultivo mixotrófico de diatomáceas utilizando glicerina como fonte de carbono.** 2013.102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

PALUDO; M. **Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: Impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico.** 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. P.; MRSKO, M. F.Biodiesel renovável derivado de microalgas: Avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013 - 2018, 2012.

PÍSKOVÁ, A. **Frustules fósseis da diatomácea do mar de Aral e do lago Baikal.** Dreamstime.com, 2010. Disponível em: https://pt.dreamstime.com/fotografia-de-stockdiatomceas-cyclotella-e-aulacoseira-spp-image14918642. Acesso em: 08 de jun. 2017, 11:09:40.

PRATIWI, A. R.; SYAH, D.; HARDJITO, L.; PANGGABEAN, L. M. G.; SUHARTONO, M. T. Fatty acid synthesis by indonesian marine diatom, *Chaetoceros gracilis*. Journal of **Biosciences**, v. 16, n. 4, p. 151 - 156, 2009.

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

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630 - 635, 2014.

RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2. Ed, WILEY-BLACKWELL, 2013. 736 p.

RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W.; ŻAROWSKA, B.; SKRZYPIŃSKI, A. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. **World Journal Microbial Biotechnology**, v. 26, p. 1217 - 1224, 2010.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660 - 667, 2002.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; GALLAS, J. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, n. 4, p. 413 - 420, 2013.

SERASPE, E. B.; GABOTERO, S.; DE LA PEÑA, M. R.; PAHILA, I. G.; AMAR, E. C. Evaluation of dietary freeze-dried *Chaetoceros calcitrans* supplementation to control *Vibrio harveyi* infection on *Penaeus monodon* juvenile. **Aquaculture**, v. 432, p. 212 - 216, 2014.

SINGH, P.; GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAWAT, I.; BUX, F. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ 671624 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 22 - 29, 2015.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: Lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415 - 422, 2015.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y.V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789 - 793, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Porto Alegre, ARTMED, 2004. 1.338 p.

TANGO, M. D. **Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

TANTANASARIT, C.; ENGLANDE, A. J.; BABEL, S. Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 446, p. 67 - 75, 2013.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide - producing bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 3, p. 61 - 73, 2015.

VERHOEF, S.; GAO, N.; RUIJSSENAARS, R. J.; WINDE, J. H. Crude glycerol as feedstock for the sustainable production of p-hydroxybenzoate by *Pseudomonas putida* S12. New **Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 114 - 119, 2014.

VISWANATHAN, T.; MANI, S.; DAS, K. C.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; SINGH, R. K.; SINGH, M. Effect of cell rupturing on the drying characteristics and lipids compositions of microalgae. **Bioresource Techonology**, v. 126, p. 131 - 136, 2012.

VLYSIDIS, A.; BINNS, M.; WEBBA, C.; THEODOROPOULOS, C. Glycerol utilization for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58 - 59, p. 1 - 11, 2011.

WADUMESTHRIGE, K.; SMITH, J. C.; WILSON, R.; SALLEY, S. O.; SIMON, K. Y. Investigation of the parameters affecting the cetane number of biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 85, p. 1073 - 1081, 2008.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7 - 11, 2013.

YEESANG, C.; CHEIRSILP, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3034 - 3040, 2011.

ZHANG, L.; BANGPING, L.; ZHONGQIU, W.; LEI, G.; ZHOU, Y. Changes in growth and photosynthesis of mixotrophic *Ochromonas* sp. in response to different concentrations of glucose. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 2671 - 2678, 2016.

ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. M.; COIMBRA, J. S. R.; MARTINS, E. C. A.; SILVA, D. X.; ROMERO, J. T. Revisão: Propriedades físico-químicas do biodiesel. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 21, p. 55 - 72, 2011.

CAPÍTULO III

ARTIGO I

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS PELA MICROALGA *Chaetoceros calcitrans* EM CULTIVO MIXOTRÓFICO: EFEITOS DE PARÂMETROS DE CULTIVO

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintetizantes capazes de produzirem determinados compostos de interesse, como lipídios, sendo esta produção resultado da interação de fatores biológicos, químicos e físicos. A microalga Chaetoceros calcitrans, pertencente à classe Bacillariophyceae, é amplamente empregada na alimentação de larvas de crustáceos marinhos e tem mostrado potencial para a obtenção de lipídios e ácidos graxos. O objetivo do trabalho foi estabelecer as melhores condições para o acúmulo de lipídios pela microalga C. calcitrans estudando parâmetros como temperatura (20, 25 e 30°C), ciclos de fotoperíodo 12C:12E h e 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração de glicerol residual GR (0, 3,37 e 5,61 g L⁻¹), silicato de sódio $(0,02; 0,08 \text{ e } 0,14 \text{ g } \text{ L}^{-1})$ e nitrato de sódio $(0,0001; 0,0002; 0,0005 \text{ e } 0,001 \text{ g } \text{ L}^{-1})$. Os experimentos foram conduzidos em uma estufa com fotoperíodo, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), aeração constante de 0,2 L min⁻¹ e concentração inicial de biomassa de 0,55 g L⁻¹. Ao término dos cultivos a biomassa foi recuperada por centrifugação e seca em estufa a 40°C e o conteúdo lipídico foi quantificado utilizando o método de Bligh e Dyer. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 95% de confianca (p<0.05). C. calcitrans foi capaz de produzir lipídios em quantidades significativas em diversas condições de cultivo. Os cultivos mixotróficos proporcionaram aumento no conteúdo lipídico independente da condição de temperatura e ciclo de fotoperíodo utilizado, quando comparado aos cultivos autotróficos. O ciclo de fotoperíodo 24C:0E h proporcionou maior acúmulo de lipídios na concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR ($45,1 \pm 1,9\%$), enquanto que para o ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, maior conteúdo lipídico foi obtido na concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR (38,1 \pm 2,3%), ambos a 30°C. Para a biomassa na mesma temperatura e ciclo de fotoperíodo de 24C:0E h, houve maior crescimento celular em ambas concentrações, 3,37 g L⁻¹ e 5,61 g L⁻¹ de GR, com 1,59 ±0,25 g L⁻¹ e 1,48 ±0,25 g L⁻¹, respectivamente. A concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, 0,0002 g L⁻¹ de nitrato de sódio, 3,37 g L⁻¹ de GR e ciclo de fotoperíodo 24C:0E h proporcionaram maior acúmulo lipídico ($45,1 \pm 1,9\%$), e $1,55 \pm 0.23$ g L⁻¹ de biomassa. Para o ciclo de fotoperíodo de 12C:12 E h, 5,61 g L⁻¹ de GR e 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, os maiores conteúdos lipídicos foram obtidos nas concentrações de 0,0001 g L⁻¹ e 0,0002 g L⁻¹ de nitrato de sódio (40,6 \pm 2,4 % e 35,6 \pm 0,7%, respectivamente).

Palavras-chave: Diatomáceas. Parâmetros de cultivo. Lipídios microbianos. Glicerol residual.
ABSTRACT

Lipid production by microalga *chaetoceros calcitrans* in mixotrophic cultivation: effects of parameters cultivation

Microalgae are photosynthetic organisms capable of producing certain compounds of interest, such as lipids, and this production is the result of the interaction of biological, chemical and physical factors. Chaetoceros calcitrans belongs to the class of Bacillariophyceae and is widely used in marine larvae crustaceans feeding, showing potential for the obtaining lipids and fatty acids. The aim of this work was to establish the best conditions for the accumulation of lipids by C. calcitrans by studying parameters such as temperature (20, 25 and 30°C), photoperiod regimes 24L:0D h and 12L:12D h (Light:Dark), concentration of crude glycerol CG (0, 3.37 and 5.61 g L^{-1}), sodium silicate (0.02, 0.08 and 0.14 g L^{-1}) and sodium nitrate (0.0001, 0.0002, 0.0005 e 0.001 g L⁻¹). The experiments were performed in an incubator with photoperiod, with irradiance of 3,000 lx (40.5 μ mol m⁻² s⁻¹), constant aeration of 0.2 L min¹ and initial biomass concentration of 0.55 g L⁻¹. At the end of cultivations, the biomass was recovered by centrifugation and dried at 40°C and the lipid content was quantified using the Bligh and Dyer method. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test at 95% confidence level (p≤0.05). C. calcitrans was able to produce lipids in significant amounts under various culture conditions. The mixotrophic cultures provided an increase in lipid content independent of the temperature and photoperiod regimes used when compared to autotrophic cultures. The photoperiod regime 24C:0E h provided higher lipid content in the concentration of $3.37 \text{g L}^{-1} \text{ CG} (45.1 \pm 1.9\%)$, whereas for the 12C:12E photoperiod regime, higher lipid content was obtained in the concentration of 5.61 g L⁻¹ CG (38.1 \pm 2.3%), both at 30°C. For the biomass, at the same temperature and with the photoperiod regime of 24C:0E h, there was higher cell growth in both concentrations, 3.37 g L^{-1} and 5.61 g L^{-1} of CG, with $1.59 \pm 0.25 \text{ g L}^{-1}$ and $1.48 \pm 0.25 \text{ g L}^{-1}$, respectively. The concentration of 0.08 g L⁻¹ sodium silicate, 0.0002 g L⁻¹ sodium nitrate, 3.37 g L⁻¹ CG and 24C:0E photoperiod regime provided greater lipid accumulation (45.1 \pm 1.9%), and 1.55 ± 0.23 g L⁻¹ biomass. For the 12C:12E photoperiod regime, 5.61 g L⁻¹ of GR and 0.14 g L⁻¹ of sodium silicate, the highest lipid amounts were obtained at the concentrations of 0.0001 g L^{-1} and 0.0002 g L^{-1} sodium nitrate (40.6 ± 2.4% and 35.6 ± 0.7%, respectively).

Keywords: Diatom. Cultivation parameters. Microbial lipids. Crude glycerol.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintetizantes capazes de produzir diversos compostos de interesse comercial. A capacidade de transformar o carbono inorgânico em carbono orgânico através de seu metabolismo torna o cultivo de microalgas interessante em processos biotecnológicos, diminuindo os custos com substratos. As microalgas possuem a característica de se adaptarem às condições ambientais e físicas a que são submetidas, tais como temperatura, iluminância, ciclo de fotoperíodo, aeração, concentração de nutrientes no meio de cultivo como carbono, nitrogênio, sais de silicatos, entre outros. Uma vez estabelecidos estes parâmetros, se pode direcionar o metabolismo para a obtenção de um determinado produto de interesse, como lipídios (LIN; WU, 2015; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013; HEMALATHA; KARTHIKEYAN; MANIMARAN, 2012).

Vários estudos têm tido foco na utilização de fonte de carbono orgânico na produção de lipídios em cultivos mixotróficos, uma vez que estes proporcionam o aumento da produção de compostos de interesses como lipídios, proteínas e carboidratos por parte destes micro-organismos. Logo, a utilização de subprodutos, como o glicerol excedente da produção de biodiesel, pode ser interessante (CERÓN-GARCÍA et al., 2013; FOO et al., 2015). O glicerol residual gerado na síntese de biodiesel, para a comercialização, necessita passar por processos de purificação, o que proporciona aumento nos custos para sua obtenção na forma pura. Como opção frente a essa alternativa de aproveitamento do excedente de glicerol, temse sua utilização como substrato em cultivos microalgais, visto que as microalgas conseguem assimilar o glicerol na sua forma não purificada para produzir metabólitos de interesse, como lipídios (CERÓN-GARCÍA et al., 2013). Dentre diversas microalgas capazes de assimilar glicerol como fonte de carbono, *Chaetoceros calcitrans*, em estudos realizados por este grupo de trabalho, mostrou-se capaz de utilizar o glicerol residual como fonte de carbono e produzir biomassa com altas porcentagens de lipídios (NOGUEIRA, 2013).

Outras fontes de nutrientes, como o nitrogênio e o silicato, têm sido investigadas. A fonte de nitrogênio é essencial para o crescimento de todas as algas e o estresse causado pela privação de nitrogênio pode resultar na redução do crescimento celular e aumento do conteúdo lipídico em várias espécies de microalgas (CHEN et al.; 2011; PRAVEENKUMAR et al.; 2012; HUANG et al. 2013; GAO; YANG; WANG, 2013). Os sais de silicato, em particular para as diatomáceas, é utilizado para sintetizar suas frústulas (HEMALATHA; KARTHIKEYAN; MANIMARAN, 2012). Fatores externos, como temperatura, intensidade da luz e fotoperíodo, são parâmetros que causam o estresse físico, podendo desempenhar papel significativo no metabolismo das microalgas, especificamente na síntese de lipídios (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013). A temperatura é importante fator no cultivo de microalgas e pode influenciar fortemente a composição em lipídios, a absorção de nutrientes, a fixação de carbono e as taxas de crescimento (SUBHASH et al., 2014). A intensidade da luz e o fotoperíodo (claro e escuro) determinam a taxa de crescimento microalgal, pois necessitam de luz como fonte de energia para sintetizar o protoplasma celular. Para tal, utilizam a luz até o limite de saturação, no entanto quando são expostas acima do limite de saturação da luz, as microalgas não conseguem absorver a luz excedente (PARMAR et al., 2011). A intensidade da luz deve ser aumentada para penetrar através da cultura (WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer as melhores condições para a produção de lipídios pela diatomácea *Chaetoceros calcitrans*, como temperatura, ciclo de fotoperíodo, concentração de glicerol residual (GR), concentração de silicato de sódio e concentração de nitrato de sódio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MICROALGA

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *C. calcitrans*, cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia - UFBA (Salvador, Bahia).

2.2. GLICEROL RESIDUAL

O GR (82,09% de pureza) foi fornecido pela empresa BS BIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo/RS, sendo o coproduto da transesterificação de óleo de soja e metanol em catálise alcalina.

2.3. ÁGUA MARINHA

A água marinha foi coletada na Estação Marinha de Aquicultura (EMA - FURG), localizada no Balneário Cassino (Rio Grande - RS). Antes de ser adicionada ao meio de cultivo, a água foi filtrada e a salinidade foi ajustada em 28 ups (unidades por salinidade), utilizando salinômetro manual (Biobrix, Modelo 211, Brasil).

2.4. PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo foi utilizado o meio Conway (WALNE, 1966), constituído por água marinha natural com salinidade ajustada em 28 ups acrescida de solução principal (2 mL L⁻¹), solução de silicatos (2 mL L⁻¹) e solução de vitaminas (0,1 mL L⁻¹).

A solução principal foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): 45 C₁₀H₁₄O₈Na₂.2H₂O; 33,6 H₃BO₃; 100 NaNO₃; 0,36 MnCl₂.4H₂O; 1,3 FeCl₃.6H₂O; 20 NaH₂PO₄.2H₂O; e 1 mL de solução traços de metais contendo (g L^{-1}) 21 ZnCl₂, 20 CoCl₂.6H₂O, 9 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O e 20 CuSO₄.5H₂O.

A solução de silicatos foi preparada com o seguinte componente (g L⁻¹): 40 Na₂OSiO₂.nH₂O.

A solução de vitaminas foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): 0,05 Vitamina B_{12} e 1 Vitamina B_1 .

No preparo do inóculo, a microalga *Chaetoceros calcitrans* foi cultivada em frascos Elenmeyer de 1 L, contendo 900 mL do meio Conway (WALNE, 1966), utilizando água marinha com ajuste de salinidade de 28 ups. Os frascos foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil) no ciclo 24C:0E h (Claro:Escuro), a iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irradiância de 3000 lx (40,5 μ mol m⁻² s⁻¹), sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min⁻¹, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para manter a esterilidade do ar. A temperatura foi mantida em 24 ± 1°C. O cultivo foi interrompido quando a concentração de biomassa atingiu 0,55 g L⁻¹, conforme estabelecido por Nogueira (2013).

3. CULTIVO NOS FOTOBIORREATORES

3.1. INÓCULO

O volume de inóculo adicionado correspondeu a 10% do volume de meio estéril (SOARES, 2010), utilizando meio Conway no seu preparo.

3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

O micro-organismo foi mantido em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 900 mL do meio Conway (WALNE, 1966), com modificações, utilizando água marinha com ajuste de salinidade em 28 ups, adicionado de GR. Os frascos foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil), a iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min ⁻¹, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para manter a esterilidade do ar. A concentração inicial de biomassa para a microalga *C. calcitrans* foi de 0,55 g L⁻¹, conforme estabelecido por Nogueira (2013).

Como variáveis do cultivo de *C. calcitrans*, foram estudadas a concentração de GR (0 g L⁻¹, correspondente ao ensaio controle, 3,37 e 5,61 g L⁻¹), conforme estabelecido por Nogueira (2013); temperatura (20, 25 e 30°C); ciclo de fotoperíodo (24C:0E h e 12C:12E h); concentração de silicatos (0,02; 0,08 e 0,14 g L⁻¹); e concentração de nitrato de sódio (0,0001; 0,0002; 0,0005 e 0,001 g L⁻¹).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e alíquotas dos cultivos foram retiradas a cada 24 h e centrifugadas a 13.000 x g por 15 min (Eppendorf, modelo 5804-R, Alemanha). O sedimento foi lavado, novamente centrifugado e ressuspendido, para leitura da absorvância.

A avaliação do crescimento celular nos cultivos foi realizada a partir da determinação da biomassa máxima (X_{max} , g L⁻¹) e biomassa final (X_{final} , g L⁻¹). A biomassa máxima compreende o valor máximo de biomassa obtido no experimento, expressa como massa seca por volume, enquanto que a biomassa final corresponde à biomassa no término do cultivo, expressa da mesma forma.

A produtividade corresponde à quantidade de biomassa produzida em um determinado intervalo de tempo, tendo sido calculada a produtividade de biomassa máxima

 $(P_{max}, em g L^{-1} h^{-1})$ e produtividade de biomassa final $(P_{final}, em g L^{-1} h^{-1})$, considerando, respectivamente, as biomassas máxima e final e os tempos de cultivos correspondentes.

3.3. OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

Ao término dos experimentos (10 dias), a biomassa obtida passou por uma etapa de separação (biomassa/meio de cultivo), sendo centrifugada a 18.800 x g por 15 min (Hitachi, modelo CR22GIII, Japão), em seguida a célula foi lavada e novamente centrifugada a 18.800 x g por 15 min. Posteriormente a biomassa obtida foi seca em estufa de recirculação de ar a 40°C até massa constante.

4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.1. CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

A concentração de biomassa foi estimada por medida da absorvância a 680 nm em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220, China), e posterior conversão à concentração (g L⁻¹) por uma curva de calibração previamente construída que relaciona a absorvância e a massa seca de biomassa (COSTA et al., 2002).

4.2. QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO

Os lipídios extraídos foram quantificados conforme Bligh e Dyer (1959), utilizando as quantidades sugeridas por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001).

Inicialmente foi tomada uma massa de 0,3 g da biomassa microalgal, previamente seca e moída, colocada em um tubo de vidro com tampa, e adicionado 5 mL de HCl 2 M, digerindo em banho-maria a 80°C durante 1 h. A seguir, resfriou-se o tubo em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 20 min (Eppendorf, modelo 5804-R, Alemanha), em seguida foi retirado o excesso de ácido e adicionado 4 mL de metanol, seguido de agitação em vórtex. Foram feitas duas adições sucessivas de 2 mL de clorofórmio seguidas de 2 min de agitação, posteriormente foram adicionados 3,6 mL de água destilada seguido de agitação por 2 min, centrifugando a 13.000 x g por 10 min. Após centrifugação foi formado um sistema trifásico, composto de uma fase inferior líquida (clorofórmio), um sólido interfacial (biomassa) e uma fase líquida superior (metanol e água). A fase inferior foi retirada utilizando uma pipeta de Pasteur, e transferida para um balão de fundo chato. Foi realizada nova re-

extração a fim de potencializar a extração dos lipídios totais da biomassa. Adicionou-se 4 mL da solução 10% metanol:clorofórmio à biomassa que estava contida no tubo de centrífuga, agitando a mistura no vórtex e centrifugando a 13.000 x g por 10 min. O segundo extrato foi obtido, juntando-o ao primeiro extrato.

Transferiu-se o extrato (lipídio dissolvido em clorofórmio) para um balão, previamente seco e pesado. Evaporou-se o excesso de solvente em evaporador rotatório a 75°C e 40 rpm. Ao final, secou-se o balão em estufa com recirculação de ar a 50°C (Quimis, modelo Q314M242, Brasil) até atingir massa constante, obtendo-se o conteúdo lipídico presente em cada uma das biomassas avaliadas. Através das Equações 2 e 3, foi possível quantificar o conteúdo lipídico e os lipídios totais.

Conteúdo Lipídico (%) = $\frac{\text{massa}_{\text{Balão+Lipídios}}(g) - \text{massa}_{\text{Balão}}(g)}{\text{massa}_{\text{Biomassa}}(g)} \times 100$ (2)

Lipídios Totais (g L⁻¹) =
$$\frac{\text{Conteúdo Lipídico(\%) \times Biomassa}_{\text{final}} (g L^{-1})}{100}$$
(3)

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 95 % de confiança ($p\leq0,05$), ou Teste t a 95 % de confiança ($p\leq0,05$), conforme a comparação realizada entre as diferentes condições experimentais testadas. Para tal, foi utilizado o software Statistica 5.0 (Stat Soft Inc., EUA).

6. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para todos os cultivos realizados foram obtidos dados relativos à biomassa máxima, biomassa final, produtividade de biomassa máxima e final, conteúdo lipídico e lipídios totais. Estes resultados são mostrados nos Apêndices B, C, D, E, F, G, H e I. Entretanto, para fins de comparação das diferentes condições de cultivo testadas, enfatizou-se a influência sobre a biomassa final e o conteúdo lipídico.

6.1. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NO ACÚMULO DE LIPÍDIOS E BIOMASSA PELA MICROALGA *C. calcitrans*

6.1.1. Influência da concentração de glicerol residual

De maneira geral ao observar a Figura 1, verifica-se que os cultivos mixotróficos proporcionaram aumento no conteúdo lipídico independente da condição de temperatura e ciclo de fotoperíodo utilizado, quando comparado aos cultivos autotróficos. Para a biomassa final mesmo comportamento foi verificado, com exceção da condição que utiliza temperatura de 25°C e ciclo de fotoperíodo 24C:0E (Figura 1D), em que não ocorreu diferenças significativas com a adição de GR no meio de cultivo.

Figura 1 - Conteúdo lipídico e concentração de biomassa final de *C. calcitrans* em diferentes condições de cultivo. □ 0 g L⁻¹ GR; 23,37 g L⁻¹ GR; 3,37 g L⁻¹ GR; 3,61 g L⁻¹ GR



*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as concentrações de glicerol residual para temperatura e ciclo de fotoperíodo fixos.

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p\geq0,05$) entre as temperaturas para ciclo de fotoperíodo e concentração de glicerol residual fixos.

*Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre os ciclos de fotoperíodo para temperatura e concentração de glicerol residual fixas.

Com relação aos dados relativos ao ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h (Figura 1A), verificou-se que a adição de GR (0 g L⁻¹ a 5,61 g L⁻¹) proporcionou aumento na

produção de lipídios independente da temperatura utilizada. A 20°C passou de 17,7 \pm 2,8% (sem adição de GR) para 32,9 \pm 1,5% (5,61 g L⁻¹ de GR). Para a biomassa final (Figura 1C), verificou-se uma maior produção na concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, com 1,19 \pm 0,33 g L⁻¹.

No cultivo utilizando a temperatura de 25°C (Figura 1A), o conteúdo lipídico passou de 19,3 \pm 0,9% para 32,1 \pm 2,5% quando 5,61 g L⁻¹ de GR foi adicionado, sendo que a adição de GR na concentração de 3,37 g L⁻¹ não contribuiu para o aumento do teor de lipídios, não diferindo estatisticamente (p \geq 0,05) do controle. Na Figura 1C, pode ser observado que a adição de GR (5,61 g L⁻¹) ocasionou aumento significativo na biomassa em relação ao cultivo autotrófico, obtendo-se 0,71 \pm 0,11 g L⁻¹.

No cultivo realizado a 30°C, para o conteúdo lipídico, a adição da fonte orgânica de carbono aumentou o conteúdo lipídio em cerca de 6 vezes, passando de $6,0 \pm 1,2\%$ (controle) para $38,1 \pm 2,3\%$ (5,61 g L⁻¹ GR), não havendo diferenças significativas (p \ge 0,05) entre as concentrações de 3,37 g L⁻¹ e 5,61 g L⁻¹ de GR. Quanto à biomassa, as mesmas diferiram entre si, alcançando 0,78 ± 0,07 g L⁻¹ na maior concentração de GR (Figura 1C).

Estudos mostram que a adição de fontes alternativas de carbono orgânico contribui para o aumento das taxas de crescimento microalgal, assim como contribui para a produção de lipídios. No estudo realizado por Heredia-Arroyo, Wei e Hu (2010), utilizando glicose como fonte de carbono nos experimentos com a microalga *Chlorella protothecoides*, verificaram que os cultivos autotrófico e mixotrófico não mostraram diferenças significativas para a produção lipídica, com aproximadamente 23%, no entanto para a biomassa o cultivo mixotrófico proporcionou aumento, alcançando 4,5 g L⁻¹, e para o cultivo autotrófico a biomassa foi de aproximadamente 1 g L⁻¹. Ao utilizarem o glicerol como fonte de carbono, obtiveram 17,5 \pm 4,98% de conteúdo lipídico e 2,33 \pm 0,93 g L⁻¹ de biomassa. Em outro estudo, Heredia-Arroyo et al. (2011), ao utilizar a microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico com glicose, obtiveram 15,43 \pm 8,32% de lipídios e 4,85 \pm 1,16 g L⁻¹ de biomassa, e com glicerol alcançaram 40,10 \pm 22,06% de lipídios e 1,17 \pm 1,34 g L⁻¹ de biomassa. Ambos os trabalhos utilizaram o tempo de cultivo de 72 h e temperatura de 26°C.

Para o ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Figura 1B), verificou-se a 20°C que o acréscimo de GR no cultivo elevou o conteúdo lipídico, de $25,9 \pm 1,3\%$ (0 g L⁻¹ de GR) para $40,2 \pm 0,7\%$ (5,61 g L⁻¹ de GR), entretanto a 25°C não houve diferenças significativas (p \ge 0,05) entre as concentrações de 3,37 g L⁻¹ e 5,61 g L⁻¹ de GR, enquanto que a 30°C o maior conteúdo lipídico (45,1 ± 1,9%) foi obtido na concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, que diferiu estatisticamente (p \le 0,05) de 0 g L⁻¹ e 5,61 g L⁻¹. Lin e Wu (2015) cultivaram a microalga *Chlorella* sp. Y8-1 durante 14 dias, à temperatura de 30°C, ciclo de fotoperíodo

24C:0E h, utilizando meio Conway modificado em cultivo autotrófico e mixotrófico (a fonte de carbono foi glicerol), e obtiveram aumento em torno de 50% no conteúdo lipídico com a adição de 1 g L⁻¹ de glicerol.

Ainda para esta condição de ciclo de fotoperíodo verificou-se que houve aumento da concentração de biomassa com a adição de GR nas temperaturas de 20 e 30°C, não havendo diferenças significativas entre 3,37 g L⁻¹ e 5,61 g L⁻¹ de GR (Figura 1D), mas este comportamento não foi observado a 25°C, em que não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de GR utilizadas, incluindo o cultivo autotrófico.

Entretanto, o efeito do aumento de GR de 3,37 g L⁻¹ para 5,61 g L⁻¹ também é dependente da temperatura e ciclo de fotoperíodo, e isso pode-ser observado na Figura 1A e 1C, em que a concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR proporcionou, na maioria dos casos, maior conteúdo lipídico, em todas as temperaturas, sendo que a 30°C este conteúdo não diferiu do obtido na concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR. A maior produção de biomassa foi obtida na concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR e temperatuar de 20°C. Para a concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, o maior aporte lipídico e biomassa foram favorecidos a 30°C, no ciclo de fotoperíodo 24C:0E, sendo que a biomassa não sofreu mudanças quando comparada à concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR. Com base nos resultados acima expostos, pode-se afirmar que, de forma geral, a adição de GR impactou positivamente o conteúdo lipídico e o crescimento celular de *C. calcitrans* ao comparar-se com o cultivo autotrófico (sem a adição de GR).

6.1.2. Influência da temperatura

Observando-se os dados relativos ao ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Figura 1A), para o cultivo autotrófico (sem adição de GR), o aumento da temperatura para 30°C levou à redução do conteúdo lipídico para $6,0 \pm 1,2\%$, enquanto que para 25°C alcançou 19,3 $\pm 0,9\%$, não diferindo (p \ge 0,05) da temperatura de 20°C. A partir da adição de GR, independente da concentração, observa-se que para a temperatura de 30°C ocorreu maior produção de lipídios. Da mesma forma, observando o ciclo 24C:0E h (Figura 1B) para uma dada concentração de GR, verificou-se que no controle o aumento da temperatura de 20°C para 25°C e 30°C ocasionou decréscimo na produção lipídica, sendo a 20°C observado o maior aporte de lipídios (25,9 $\pm 1,3\%$). Wahidin, Idris e Shaleh (2013) utilizaram em seu trabalho a microalga *Nannochloropsis* sp., obtendo conteúdo lipídico de 27,9% para o ciclo 24C:0E h e 25,6% para o ciclo 12C:12E h, a 23°C, em cultivo autotrófico e meio de cultivo semelhante ao meio Walne utilizado neste trabalho. No ciclo 24C:0E h, na concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, observa-se que a temperatura de 30°C resultou no maior conteúdo lipídico (45,1 \pm 1,9%), diferindo significativamente das demais temperaturas, na mesma concentração de GR. Enquanto que para a concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, situação contraria ocorreu, uma vez que na menor temperatura testada (20°C) foi obtido o maior acúmulo lipídico, atingindo 40,2 \pm 0,7%, diferindo estatisticamente das demais temperaturas, nesta mesma concentração de GR.

Para a biomassa no ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h (Figura 1C), verifica-se que o aumento da temperatura ocasionou redução na biomassa no cultivo autotrófico (sem adição de GR), passando de $0,55 \pm 0,05$ g L⁻¹ a 20°C para $0,22 \pm 0,01$ g L⁻¹ a 30°C. Para a concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, a temperatura não influenciou na biomassa, enquanto que para a concentração 5,61 g L⁻¹ de GR a produção de biomassa foi estimulada na temperatura de 20°C, com 1,19 \pm 0,33 g L⁻¹.

No ciclo de fotoperíodo de 24C:0E h (Figura 1 D), observa-se que para o cultivo autotrófico a variação da temperatura não exerceu influência no crescimento celular. Para as concentrações de 3,37 g L⁻¹ e 5,61 g L⁻¹ de GR, a temperatura de 25°C ocasionou diminuição da biomassa comparado a 20 e 30°C. A temperatura de 30°C proporcionou aumento da biomassa para ambas as concentrações de GR, sendo que a maior produção de biomassa foi alcançada na concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, com 1,59 \pm 0,25 g L⁻¹, não diferindo (p≥0,05) da concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR (1,48 \pm 0,25 g L⁻¹).

Em se tratando de conteúdo lipídico, observa-se que os maiores acúmulos foram obtidos a 30°C, no ciclo de 12C:12E (Figura 1A), enquanto que para o ciclo 24C:0E (Figura 1B), as temperaturas de 20 e 30°C proporcionaram maiores acúmulos, ambas situações para os cultivos mixotróficos. Para a biomassa, a maior produção se deu a 20°C, na concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR e ciclo de fotoperíodo de 12C:12E (Figura 1C), enquanto que a temperatura de 30°C promoveu maiores biomassas para ambas concentrações de GR, no ciclo de fotoperíodo 24:0E (Figura 1D).

6.1.3. Influência dos ciclos de fotoperíodo

Quando comparados os ciclos de luminosidade 12C:12E h (Figura 1A) e 24C:0E h (Figura 1B) à temperatura de 20°C, nos cultivos autotróficos, verifica-se que o ciclo 24C:0E h proporcionou aumento do conteúdo lipídico, passando de 17,7 \pm 2,8% (12C:12E h) para 25,9 \pm 1,3% (24C:0E h). A 20°C, na concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, não houve diferença significativa na produção de lipídios, entretanto para a concentração de GR de

5,61 g L⁻¹ houve aumento do conteúdo lipídico com a passagem de 12C:12E h para 24C:0E h. A 25°C houve redução significativa no teor de lipídios com a passagem do ciclo 12C:12E h para 24C:0E h para o cultivo autotrófico e com adição de 5,61 g L⁻¹ de GR. Para a concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, não foi observada diferença significativa entre os ciclos. A 30°C pode-se verificar que com a mudança do ciclo de 12C:12E h para 24C:0E h houve aumento significativo do conteúdo lipídico para o cultivo autotrófico (6,0 ± 1,2% para 13,5 ± 2,4%) e para o cultivo mixotrófico com adição de 3,37 g L⁻¹ de GR (de 36,6 ± 2,6% para 45,1 ± 1,9%), e para a concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR houve a redução deste conteúdo com a mudança do ciclo para 24C:0E h (de 38,1 ± 2,3% para 33,2 ± 1,1%).

A biomassa (Figura 1C e 1D) apresentou acréscimos significativos com a mudança de 12C:12E h para 24C:0E h para as duas concentrações de GR estudadas na temperatura de 30°C, não mostrando diferenças em 20°C e 25°C. Babuskin et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes intensidades luminosas e ciclo de fotoperíodo em cultivo fotoautotrófico e mixotrófico da microalga *Isochrysis galbana*. Observaram que para os cultivos com iluminação contínua, fotoperíodo de 24C:0E h para intensidades luminosas variáveis (50, 100 e 150 μ mol m⁻² s⁻¹), foram observadas menores concentrações de biomassa para as diferentes misturas de carbono orgânico (20:80% melaço: glicose; 20:80% glicerol: glicose e 40:60% melaço: glicose), enquanto que para o conteúdo lipídico as maiores porcentagens foram atingidas com fotoperíodo de 18C:06E h em todas as intensidades luminosas e misturas de carbono orgânico. Na maior intensidade luminosa (150 μ mol m⁻² s⁻¹) ocorreu a redução da produtividade da biomassa para os três fotoperíodos testados (12C:12E h, 18C:06E h e 24C:0E h), sendo que este comportamento foi atribuído à fotoinibição.

O ciclo de fotoperíodo 24C:0E proporcionou maior acúmulo de lipídios na concentração de 3,37g L⁻¹ de GR, enquanto que para o ciclo de fotoperíodo 12C:12E maior conteúdo lipídico foi obtido na concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, ambos a 30°C. Para a biomassa no ciclo de fotoperíodo de 24C:0E, houve maior crescimento celular em ambas concentrações de GR a 30°C.

Para realizar o estudo da influência de silicato de sódio na produção de lipídios pela microalga *C. calcitrans* foram selecionadas, com base na maior produção de lipídios, duas distintas condições, sendo elas: Condição 1 (ciclo de fotoperíodo de 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR) e Condição 2 (ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR), ambas na temperatura de 30 °C.

6.1.4. Influência da concentração de silicato de sódio

Neste trabalho foram testadas diferentes concentrações de silicato (0,02; 0,08 e $0,14 \text{ g L}^{-1}$). A concentração de 0,08 g L⁻¹ é a concentração do meio Conway. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.

Ao observar a Figura 2, para o ciclo de fotoperíodo 24C:0E h e concentração de GR de 3,37 g L⁻¹ (condição 1) verifica-se que a mudança na concentração de silicato de sódio em relação ao valor inicialmente utilizado (0,08 g L⁻¹) ocasionou uma queda no conteúdo lipídico, para $34,5 \pm 4,2\%$ (0,02 g L⁻¹ de silicato) e $31,2 \pm 0,8\%$ (0,14 g L⁻¹ silicato), respectivamente, estes não diferindo estatisticamente entre si (Figura 2A). O maior valor obtido, $45,1 \pm 1,9\%$, foi encontrado para concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio. Para o crescimento celular, as concentrações de 0,02 g L⁻¹ e 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio obtiveram maior biomassa com $1,26 \pm 0,17$ g L⁻¹ e $1,55 \pm 0,23$ g L⁻¹, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas entre si. Com o aumento da concentração para 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio houve redução da biomassa para $1,17 \pm 0,07$ g L⁻¹, não mostrando diferenças significativas quando comparada à concentração de 0,02 g L⁻¹ de silicato de sódio (Figura 2B).

Figura 2 - Conteúdo lipídico e concentração de biomassa final de *C. calcitrans* em diferentes concentrações de silicato de sódio. □ 0,02 g L⁻¹ Na₂OSiO₂.nH₂O, 20,08 g L⁻¹ Na₂OSiO₂.nH₂O (controle), ∞ 0,14 g L⁻¹ Na₂OSiO₂.nH₂O



*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre as concentrações de silicato de sódio para uma mesma condição (ciclo de fotoperíodo e concentração de GR fixos).

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre as condições 1 e 2 (ciclo de fotoperíodo e concentração de GR distintos) para concentração de silicato de sódio fixa.

***Condição 1 -** Ciclo de fotoperíodo de 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, temperatura de 30°C.

*Condição 2 - Ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração de 5,61 g L^{-1} de GR, temperatura de 30°C.

Para o ciclo de fotoperíodo 12C:12E h e 5,61 g L⁻¹ de GR (condição 2), verificase que, independente da concentração de silicato utilizada, não houve variação no conteúdo lipídico, não havendo diferenças significativas (Figura 2A). Porém, ao observar-se a biomassa final (Figura 2B), verifica-se que a maior produção ocorreu na concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, atingindo 1,36 \pm 0,03 g L⁻¹, diferindo estatisticamente das demais concentrações (0,91 \pm 0,08 g L⁻¹ para 0,02 g L⁻¹ silicato de sódio e 0,78 \pm 0,07 g L⁻¹ para 0,08 g L⁻¹ silicato de sódio, que não foram diferentes estatiticamente entre si).

Ao comparar as condições 1 e 2, observa-se que para o cultivo na concentração de 0,02 g L⁻¹ de silicato de sódio, não houve impacto significativo na produção de lipídios (Figura 2A), porém ocorreu redução da biomassa da passagem da condição 1 para a 2 $(1,26 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}\text{para } 0,91 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1})$, respectivamente (Figura 2B). Para a concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio verificou-se maior produção de lipídios (45,1 ± 1,9%) e de biomassa (1,55 ± 0,23 g L⁻¹) na condição 1. Na mudança da condição 1 para a condição 2 houve redução desses valores (38,1 ± 2,3% e 0,78 ± 0,07 g L⁻¹, respectivamente). E na concentração de 0,14 g L⁻¹ houve aumento significativo do conteúdo lipídico e da biomassa, quando mudou da condição 1 para a 2. Estudos relatam que a presença de sais de silicato no meio de cultivo de diatomáceas é importante, pois este nutriente auxilia na formação da parede celular auxiliando no crescimento celular (HEMALATHA; KARTHIKEYAN; MANIMARAN, 2012; YANG; ZHAO; XIE, 2014).

Hemalatha, Karthikeyan e Manimaran (2012) estudaram os efeitos da temperatura e das concentrações de nitrato e silicato, na obtenção de biomassa, proteínas e carboidratos pela diatomácea *Cheatoceros simplex*, e verificaram que a maior temperatura testada (29°C) proporcionou maior crescimento celular (23,5 x 10^5 cells mL⁻¹) nas concentrações de 1764 μ M [NO₃⁻] e 212 μ M [SiO₃²]. Nestas mesmas concentrações, os maiores conteúdos de carboidratos (0,78 ± 0,03, 0,68 ± 0,05 e 0,64 ± 0,04 pg cel⁻¹) foram obtidos nas temperaturas de 25°C, 20°C e 29 °C, respectivamente. A maior produção de proteína (4,48 ± 0,17 pg cell⁻¹) foi obtida a 25°C, para a concentraçõe de 2205 μ M [NO₃⁻] e 265 μ M [SiO₃²]. A biomassa, o conteúdo de carboidratos e de proteínas tiveram diminuições em seus valores quando utilizados concentrações menores ou maiores de nitrato e silicato do que as citadas anteriormente. Os autores atribuíram esses resultados a mudanças nas fontes de nutrientes, que ocasionam alterações nas taxas de crescimento e causam efeitos significativos na produção de proteínas e carboidratos. Ainda afirmaram que os carboidratos são utilizados como reserva de energia química nas diatomáceas e que o aumento desta reserva de energia no fitoplâncton está associada à senescência e à formação de esporos.

Yang, Zhao e Xie (2014) realizaram o estudo sobre o efeito do silicato de sódio no crescimento celular de cinco espécies de diatomáceas (*Naviculata patrickae* 5#, *Nitzschia panduriformis* 6#, *Naviculata thienemannii* 7#, *Nitzschia longíssima* 8# e *Naviculata atomus* 9#), e observaram que na ausência de silicato de sódio as microalgas tiveram um crescimento lento, e com o aumento das concentrações de silicato de sódio o crescimento foi sendo intensificado, atingindo diferentes taxas de crescimento celular para cada espécie. As microalgas 5#, 6#, 7#, 8# e 9# alcançaram as maiores taxas de crescimento celular (μ_{max}) no 4°, 2°, 6°, 4° e 6° dia, respectivamente, com concentrações ótimas de silicato de sódio de sódio

Na continuidade do trabalho, para avaliar a produção de lipídios em relação à concentração da fonte de nitrogênio, foram estabelecidas as novas concentrações de silicato de sódio levando em consideração maior acúmulo lipídico e biomassa. Desta forma, foi fixada para a condição 1: ciclo de fotoperíodo 24C:0E h com adição de 3,37 g L⁻¹ de GR e concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, uma vez que nesta concentração de silicato de sódio foram obtidos maiores conteúdo lipídico e biomassa. E para a condição 2: ciclo de fotoperíodo 12C:12E h com adição de 5,61 g L⁻¹ de GR e concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio testadas, observou-se um aumento significativo da biomassa nesta concentração de silicato de sódio testada do testada (0,14 g L⁻¹).

6.1.5. Influência da concentração de nitrato de sódio

O nitrogênio é um nutriente importante em cultivos microalgais, uma vez que exerce influência no crescimento celular e na produção de lipídios. Neste trabalho foram testadas as concentrações de 0,0001; 0,0005 e 0,001 g L⁻¹ de NaNO₃, sendo a concentração de 0,0002 g L⁻¹ NaNO₃ a inicialmente utilizada. Estas concentrações foram testadas para as duas condições experimentais estabelecidas com base nos resultados anteriores, sendo os resultados apresentados na Figura 3.

Na Figura 3, a maior produção de lipídios na condição 1 (24C:0E h, 3,37 g L⁻¹ de GR e 0,08 g L⁻¹ de silicato) foi de 45,1 \pm 1,9% de conteúdo lipídico na concentração de 0,0002 g L⁻¹ NaNO₃, diferindo das demais concentrações. Nesta condição, a biomassa obtida foi de 1,55 \pm 0,23 g L⁻¹. Verifica-se também que o aumento na concentração NaNO₃ resultou na redução do conteúdo lipídico, para 10,3 \pm 0,7% (0,0005 g L⁻¹ de NaNO₃) e 8,2 \pm 1,1% para (0,001 g L⁻¹ de NaNO₃). Mesmo comportamento ocorreu com a produção de biomassa, que

passou para $0,63 \pm 0,06$ g L⁻¹ (0,0005 g L⁻¹ de NaNO₃) e para $0,48 \pm 0,09$ g L⁻¹ (0,001 g L⁻¹ de NaNO₃). Na condição 2 (12C:12E h, 5,61 g L⁻¹ de GR e 0,14 g L⁻¹ de silicato), verificou-se que nas menores concentrações de NaNO₃ (0,0001 g L⁻¹ e 0,0002 g L⁻¹) também foram obtidos maiores conteúdos lipídicos ($40,6 \pm 2,4\%$ e $35,6 \pm 0,7\%$, respectivamente), que não diferiram entre si. Para estas concentrações de nitrato, as biomassas obtidas foram de $0,67 \pm 0,01$ g L⁻¹ e de $0,78 \pm 0,07$ g L⁻¹, respectivamente. O aumento da concentração para 0,0005 g L⁻¹ de NaNO₃ ocasionou diminuição do conteúdo lipídico ($30,5 \pm 3,6\%$) e aumento da biomassa ($0,93 \pm 0,10$ g L⁻¹), em relação aos valores obtidos para 0,0001 g L⁻¹ de NaNO₃.

Figura 3 - Conteúdo lipídico e biomassa final de *C. calcitrans* em diferentes concentrações de nitrato de sódio. \Box 0,0001 g L⁻¹ NaNO₃, \boxtimes 0,0002 g L⁻¹ NaNO₃, \boxtimes 0,0005 g L⁻¹ NaNO₃



*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as concentrações de nitrato de sódio, para uma mesma condição (ciclo de fotoperíodo, concentração de GR e silicato fixos). *Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as condições 1 e 2 (ciclo de fotoperíodo, concentração de GR e silicato distintos) para concentração de nitrato de sódio fixa. ***Condição 1** – Ciclo de fotoperíodo de 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, temperatura de 30°C.

***Condição 2 -** Ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, temperatura de 30°C.

Quando comparadas as condições de cultivo, verifica-se o aumento da produção lipídica nas concentrações de 0,0001 g L⁻¹; 0,0005 g L⁻¹ e 0,001 g L⁻¹ na mudança da condição 1 para 2. Apenas com a concentração de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃ houve diminuição do conteúdo lipídico ao passar para a condição 2. O mesmo comportamento da produção de lipídios foi observado para a biomassa, com exceção da concentração de 0,001 g L⁻¹ de NaNO₃, em que não houve alteração na produção de biomassa com a mudança para a condição de cultivo 2.

Em seus estudos, Huang et al. (2013), com as microalgas *Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata* e *Pavlova viridis*, utilizando meio f/2 e ciclo de fotoperíodo 14C:10E h, observaram o mesmo comportamento, em que o conteúdo lipídico aumentou com a diminuição da fonte de nitrogênio. Gao, Yang e Wang (2013) cultivaram as

microalgas *Chaetoceros muelleri* (*Bacillariophyceae*) e *Dunaliella salina* (*Cloroficea*), cultivadas sob diferentes condições nutricionais, utilizando o meio f/2, com irradiância de $45 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, ciclo de fotoperíodo 14C:10E h e temperatura de 20°C. Nestas condições o mais elevado conteúdo lipídico para *C. muelleri* (46,32 ± 3,53%) e *D. salina* (54,15 ± 2,71%) foi conseguido na privação de nitrogênio e em água marinha artificial (sem os nutrientes do meio f/2), respectivamente. O acúmulo de lipídios nestas condições parece ser uma resposta ao estresse causado pela privação de nutrientes. No entanto, parece haver relação inversa entre a biomassa e o acúmulo de lipídios em microalgas sob condições de privação de nitrogênio. Baixo teor nitrogênio aumenta o acúmulo de lipídios em que há diferentes parâmetros sendo avaliados é importante levar em consideração os efeitos sinérgicos desses fatores, uma vez que estes contribuem para o acúmulo de lipídios, sendo imprescindível para obtenção de taxas máximas.

7. CONCLUSÃO

A microalga *C. calcitrans* foi capaz de acumular quantidades significativas de lipídios em diferentes condições de cultivo mixotrófico, mostrando sua potencialidade para a bioconversão do glicerol residual em biomassa como fonte de lipídios. A adição de glicerol residual teve um impacto positivo no acúmulo de lipídios e na produção de biomassa em ambos os ciclos de fotoperíodo estudados (12C:12E h e 24C:0E h), quando comparado com o cultivo autotrófico, enquanto que a produção de lipídios foi favorecida à temperatura de 30°C. O aumento da concentração de silicato de sódio não influenciou no acúmulo de lipídios, entretanto impactou positivamente a biomassa, apenas no fotoperíodo 12C:12E h. Já o nitrato de sódio, quando utilizado em menores concentrações, proporcionou o aumento do conteúdo lipídico em ambos os ciclos de fotoperíodo. Portanto, o excesso de carbono e a privação de nitrogênio no meio de cultivo são condições favoráveis para o acúmulo de lipídios por *C. calcitrans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABUSKIN, S.; RADHAKRISHNAN, K.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M. SUKUMAR, M. Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1653 – 1660, 2014.

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

CERÓN-GARCÍA, M. C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; CONTRERAS-GÓMEZ, A.; MOLINA-GRIMA, E. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semicontinuous modes. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 569 - 576, 2013.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1649 - 1655, 2011.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603 - 607, 2002.

FOO, S. C.; YUSOFF, F.; ISMAIL, M.; BASRI, M.; CHAN, K. W.; KHONG, N. M. H.; YAU, S. K. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. **Algal Research**, v. 12, p. 26 - 32, 2015.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484 - 491, 2013.

HEMALATHA, A.; KARTHIKEYAN, P.; MANIMARAN, K. Effect of temperature on the growth of marine diatom, *Chaetoceros simplex* (Ostenfeld, 1901) with different nitrate: silicate concentrations. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, p. S1817 - S1821, 2012.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245 - 2253, 2011.

HUANG, X.; HUANG, Z.; WEN, W.; YAN, J. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium of the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). Journal of Applied Phycology, v. 25, p. 129 - 137, 2013.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, p. 4607 - 4638, 2013.

LIN, T., WU, J. Effect of sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 100 - 107, 2015.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and modified Bligh & Dyer extraction methods. Journal of Food Composition and Analysis, v. 14, p. 93 - 100, 2001.

NOGUEIRA, D. A. **Cultivo mixotrófico de diatomáceas utilizando glicerina como fonte de carbono**. 2013.102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

PARMAR, A.; SINGH, N.K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163 - 10172, 2011.

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

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y.V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789 - 793, 2014.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, n. 129, p. 7 - 11, 2013.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, v. 25, p. 1 - 53, 1966.

YANG, M.; ZHAO, W.; XIE, X. Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. Acta Ecologia Sinica, v. 34, p. 311 - 319, 2014.

ARTIGO II

LIPÍDIOS DE *Chaetoceros calcitrans* EM CULTIVO MIXOTRÓFICO COM GLICEROL RESIDUAL: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIODIESEL

RESUMO

A biomassa de microalgas é rica em lipídios que podem ser utilizados na indústria alimentícia, de fármacos, cosméticos e de bicombustíveis, sendo tais aplicações definidas de acordo com o perfil de ácidos graxos da biomassa produzida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética do acúmulo de lipídios e perfil de ácidos graxos de *Chaetoceros calcitrans* obtida em cultivo mixotrófico com glicerol residual (GR), em diferentes condições de cultivo, bem como, a partir de correlações empíricas, predizer as propriedades do biodiesel com este material graxo. Foram avaliadas as condições de cultivo: ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio e de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃ (condição 1); e ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio e 0,0001 g L⁻¹ de NaNO₃ (condição 2). Os lipídios foram extraídos conforme o método de Bligh e Dyer e o perfil ácido graxos foi determinado por cromatografía gasosa. A predição das propriedades do biodiesel foi realizada a partir das propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 95 % de confiança a (p ≤ 0.05). A condição 1 resultou em 43,2 ± 1,2% de conteúdo lipídico no 6° dia de cultivo, nesse tempo a biomassa atingiu 0.63 ± 0.02 g L⁻¹. Na condição 2, o conteúdo lipídico oscilou entre $35.6 \pm 3.7\%$ (3° dia) e $40.7 \pm 3.9\%$ (10° dia). Para a biomassa, atingiu-se 1.64 ± 0.04 g L⁻¹ no 8° dia de cultivo. A condição 1 proporcionou maiores porcentagens de ácidos graxos saturados nos tempos de 8 e 10 dias de cutivo $(18,4 \pm 3,7 \% \text{ e } 19,4 \pm 1,4\%, \text{ respectivamente})$, sendo maior produção do ácido palmítico $(16,0 \pm 4,3\% \text{ e } 17,2 \pm 1,5\%)$, respectivamente), enquanto que a condição 2 resultou maior produção de ácidos graxos monoinsaturados no tempo de 6 dias de cultivo $(84.5 \pm 1.1\%)$, sendo $30.1 \pm 3.6\%$ de ácido tetradecenoico e $53.4 \pm 3.8\%$ de ácido palmitoleico. Para os ácidos graxos poli-insaturados, a condição 1 proporcionou maiores teores nos tempos de 3 e 6 dias de cultivo $(45,3 \pm 6,1\% \text{ e } 44,8 \pm 3,2\% \text{ respectivamente})$, com $12,0 \pm 2,8\%$ (3 dia) e $11,8 \pm 1,4\%$ (6° dia) de ácido linoleico; $27,2 \pm 5,4\%$ (3 dias) e $27,2 \pm 4,2\%$ (6 dias) de ácido y-linolênico e $6,1 \pm 0,6\%$ (3 dias) e $5,8 \pm 0,3\%$ (6 dias) de ácido α -linolênico. Para a condição 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio e de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃), em 8 dias de cultivo, foi obtido $46,63 \pm 0,89$ para número de cetano, $3,66 \pm 0,01 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ de viscosidade cinemática, $881,19 \pm 3,91 \text{ kg m}^{-3}$ de massa específica e 39.19 ± 0.07 kJ g⁻¹ para calor de combustão, todos parâmetros dentro dos limites estabelecidos pelas normas brasileira, europeia e americana.

Palavras-chave: Diatomáceas. Lipídios microbianos. Glicerol residual. Biodiesel.

ABSTRACT

Lipids of *Chaetoceros calcitrans* in mixotrophic cultivation with crude glycerol: Fatty acid profile and prediction of physico-chemical biodiesel properties

The microalgae biomass is rich in lipids that can be used in the food, pharmaceutical, cosmetic and biofuel industries, and these applications are defined according to the fatty acid profile of the biomass produced. The objective of this work was to evaluate the kinetics of lipid accumulation and fatty acid profile of Chaetoceros calcitrans obtained in mixotrophic culture with crude glycerol (CG) in different culture conditions, as well as, from empirical correlations, to predict the biodiesel properties with this fatty material. The culture conditions were: photoperiod regime 24C:0E h, concentration of 3.37 g L⁻¹ of CG, 0.08 g L⁻¹ of sodium silicate and 0.0002 g L⁻¹ of NaNO₃ (condition 1); and photoperiod regime 12C:12E h, 5.61 g L⁻¹ of CG, 0.14 g L⁻¹ of sodium silicate and 0.0001 g L⁻¹ of NaNO₃ (condition 2). Lipids were extracted according to the Bligh and Dyer method and the fatty acid profile was determined by gas chromatography. The prediction of the biodiesel properties was made from the individual properties of the fatty acid methyl esters. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test at 95% confidence level ($p \le 0.05$). Condition 1 resulted in $43.2 \pm 1.2\%$ lipid content on the 6th day of cultivation, at which time the biomass reached 0.63 ± 0.02 g L⁻¹. In condition 2, lipid content ranged from $35.6 \pm 3.7\%$ (3th day) to $40.7 \pm 3.9\%$ (10th day). The biomass reached 1.64 ± 0.04 g L⁻¹ on the 8th day of cultivation. Condition 1 provided higher percentages of saturated fatty acids at 8 and 10 days $(18.4 \pm 3.7\%$ and $19.4 \pm 1.4\%$, respectively), with a higher production of palmitic acid $(16.0 \pm 4.3\%$ and $17.2 \pm 1.5\%$, respectively), whereas condition 2 had higher production of monounsaturated fatty acids at 6 days of culture $(84.5 \pm 1.1\%)$, $30.1 \pm 3.6\%$ of tetradecenoic acid and $53.4 \pm 3.8\%$ of palmitoleic acid. For polyunsaturated fatty acids, condition 1 provided higher levels at 3 and 6 days of culture $(45.3 \pm 6.1\% \text{ and } 44.8 \pm 3.2\%, \text{ respectively})$, with $12.0 \pm 2.8\%$ (3th day) and $11.8 \pm 1.4\%$ (6th day) of linoleic acid; $27.2 \pm 5.4\%$ (3 days) and $27.2 \pm 4.2\%$ (6 days) of y- linolenicacid and $6.1 \pm 0.6\%$ (3 days) and $5.8 \pm 0.3\%$ (6 days) of α -linolenic acid. For the condition 1 (photoperiod regime 24C:0E h, concentration of 3.37 g L⁻¹ of CG, 0.08 g L⁻¹ of sodium silicate and 0.0002 g L⁻¹ of NaNO₃) in 8 days of cultivation, it was obtained 46.63 ± 0.89 cetane number, 3.66 ± 0.01 mm² s⁻¹ kinematic viscosity, 881.19 ± 3.91 kg m⁻³ specific mass and 39.19 ± 0.07 kJ g⁻¹ heat of combustion, all parameters within the limits established by Brazilian, European and American standards.

Keywords: Diatom. Microbial lipids. Crude glycerol. Biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

A produção de lipídios em células de microalgas é afetada por uma série de fatores ambientais como intensidade de luz, ciclo de fotoperíodo (PRATIWI et al., 2009; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013), temperatura (SUBHASH et al., 2014), concentração de nitrogênio (YANG; ZHAO; XIE, 2014) e carbono (HEREDIA-ARROYO; WEI; HU, 2010), salinidade e sais de silicato (em diatomáceas) (HEMALATHA; KARTHIKEYAN; MANIMARAN, 2012), entre outros. Tais fatores influenciam diretamente no acúmulo de lipídios e no perfil dos ácidos graxos componentes (PRATIWI et al., 2009; LV et al., 2010; LI et al., 2014). A cinética lipídica fornece informações importantes sobre o perfil de lipídios produzidos por determinado micro-organismo, sendo possível estabelecer o tempo de cultivo para a produção de determinado ácido graxos saturados (AGS), mono-insaturados (AGM) e poli-insaturados (AGP), sendo que isto se dá em função da fase do crescimento celular, das condições de cultivo e de como o micro-organismo sintetiza os lipídios ao longo do crescimento (PRATIWI et al., 2009; LEE et al., 2011).

Por outro lado, os lipídios provenientes de microalgas possuem potencial para a produção de biodiesel e outros combustíveis. A biomassa microalgal pode ser utilizada para produzir gasolina, diesel e querosene com características equivalentes aos derivados do petróleo (CHISTI, 2012). No caso da produção de biodiesel, têm sido observado para as microalgas perfis de ácidos graxos semelhantes aos encontrados em óleos vegetais, matéria-prima para a produção de biodiesel de primeira geração (BÉLIGON et al., 2016).

A qualidade do biodiesel é expressa através de parâmetros físico-químicos, cujos limites são estabelecidos a partir de normas, como a europeia (EN 14214) e a americana (ASTM D6751). A determinação experimental destes parâmetros onera custos e gasto de tempo, sendo uma alternativa a predição das propriedades, como viscosidade cinemática, massa específica, índice de iodo, número de cetano e calor de combustão, a partir de correlações empíricas, que levam em conta o perfil de ácidos graxos produzidos pelas microalgas (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012; DUARTE; MAUGERI, 2014).

A biomassa da microalga *Chaetoceros calcitrans* em estudos anteriores por este grupo de trabalho, foi cultivada em meio contendo glicerol residual e o perfil de ácidos graxos mostrou altas porcentagens de ácidos graxos saturados (42,6%), com maior proporção de ácido palmítico (22,5%), 27% para os ácidos graxos moni-insaturados, com maior proporção

de ácido oleico (17,7%), e 30,4% de ácidos graxos poli-insaturados, com 11% do ácido α linolênico e 9,7% de γ -linolênico (NOGUEIRA, 2013), mostrando o potencial desta microalga para produção de lipídios e, pela composição de ácidos graxos contida em sua biomassa, apresentando possível aplicação para a produção de biocombustíveis.

Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi estabelecer a cinética de produção de lipídios da microalga *C. calcitrans* submetida a duas distintas condições de cultivo, avaliando os perfís de ácidos graxos, bem como predizer as propriedades do biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MICROALGA

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *C. calcitrans,* cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia – UFBA (Salvador, Bahia).

2.2. GLICEROL RESIDUAL

O glicerol residual (82,09% de pureza) foi fornecido pela empresa BS BIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo/RS, sendo o coproduto da transesterificação de óleo de soja e metanol em catálise alcalina.

2.3. ÁGUA MARINHA

A água marinha foi coletada na Estação Marinha de Aquicultura (EMA - FURG), localizada no Balneário Cassino (Rio Grande-RS). Antes de ser adicionada ao meio de cultivo, a água foi filtrada e a salinidade foi ajustada em 28 ups (unidades por salinidade), utilizando salinômetro manual (Biobrix, Modelo 211, Brasil).

2.4. PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo foi utilizado o meio Conway (WALNE, 1966), constituído por água marinha natural com salinidade ajustada em 28 ups acrescida de solução principal (2 mL L⁻¹), solução de silicatos (2 mL L⁻¹) e solução de vitaminas (0,1 mL L⁻¹).

A solução principal foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): 45 C₁₀H₁₄O₈Na₂.2 H₂O; 33,6 H₃BO₃; 100 NaNO₃; 0,36 MnCl₂.4 H₂O; 1,3 FeCl₃.6 H₂O; 20 NaH₂PO₄.2 H₂O; 1mL de solução traços de metais contendo (g L^{-1}) 21 ZnCl₂, 20 CoCl₂.6H₂O, 9 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O e 20 CuSO₄.5H₂O.

A solução de silicato foi preparada com o seguinte componente (g L⁻¹): 40 Na₂OSiO₂.nH₂O.

A solução de vitaminas foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): 0,05 Vitamina B_{12} e 1 Vitamina B_1 .

No preparo do inóculo, a microalga *C. calcitrans* foi cultivada em frascos Elenmeyer de 1 L, contendo 900 mL do meio Conway (WALNE, 1966), utilizando água marinha com ajuste de salinidade de 28 ups. Os frascos foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil) no ciclo 24C:0E h (Claro:Escuro), a iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irradiância de 3000 lx (40,5 μ mol m⁻² s⁻¹), sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min⁻¹, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para manter a esterilidade do ar. A temperatura foi mantida em 24 ± 1°C. O cultivo foi interrompido quando a concentração de biomassa atingiu 0,55 g L⁻¹, conforme estabelecido por Nogueira (2013).

3. CULTIVO NOS FOTOBIORREATORES

3.1. INÓCULO

O volume de inóculo adicionado correspondeu a 10% do volume de meio estéril (SOARES, 2010), utilizando meio Conway.

3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

O micro-organismo foi mantido em fotobiorreatores, do tipo Erlenmeyer de 2 L, contendo 1800 mL do meio Conway (Walne, 1966), utilizando água marinha com ajuste de salinidade em 28 ups, adicionado de glicerol residual (GR). Os fotobiorreatores foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil), à temperatura de 30°C, a iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min⁻¹, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de

vidro para manter a esterilidade do ar. A concentração inicial de biomassa foi de 0,55 g L⁻¹, conforme estabelecido por Nogueira (2013).

3.3. CINÉTICA DO ACÚMULO DE LIPÍDIOS

Para o estudo da cinética do acúmulo de lipídios foram estabelecidos os tempos de 3, 6, 8 e 10 dias de cultivo. Os experimentos foram conduzidos em biorreatores do tipo Erlenmeyer de 2 L e foram estudadas as seguintes condições de cultivo: ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio e concentração de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃, correspondendo à condição 1; ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio e concentração de 0,0001 g L⁻¹ de NaNO₃, correspondendo à condição 2. Os experimentos foram realizados em triplicata e nos tempos citados as biomassas passaram por uma etapa de separação (biomassa/água), centrifugando-se a 18.800 x g por 15 min, em seguida foi adicionada água destilada e novamente centrifugada a 18.800 x g por 15 min. Posteriormente, as biomassas foram liofilizadas e caracterizadas quanto ao conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

Os lipídios foram extraídos conforme Bligh e Dyer (1959), utilizando as quantidades de biomassa sugeridas por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001).

Inicialmente foi tomada uma massa de 0,3 g da biomassa microalgal, previamente seca e macerada, colocada em um tubo de vidro com tampa, e adicionado 5 mL de HCl 2 M, digerindo em banho-maria a 80°C durante 1 h. A seguir, resfriou-se o tubo em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 20 min (Eppendorf, modelo 5804-R, Alemanha), em seguida foi retirado o excesso de ácido e adicionado 4 mL de metanol, seguido de agitação em vórtex. Foram feitas duas adições sucessivas de 2 mL de clorofórmio seguidas de 2 min de agitação, posteriormente foram adicionados 3,6 mL de água destilada seguido de agitação por 2 min, centrifugando a 13.000 x g por 10 min. Após centrifugação foi formado um sistema trifásico, composto de uma fase inferior líquida (clorofórmio), um sólido interfacial (biomassa) e uma fase líquida superior (metanol e água). A fase inferior foi retirada utilizando uma pipeta de Pasteur, e transferida para um balão de fundo chato. Foi realizada re-extração a fim de potencializar a extração dos lipídios totais da biomassa. Adicionou-se 4 mL da solução

10% metanol:clorofórmio à biomassa que estava contida no tubo de centrífuga, agitando a mistura no vórtex e centrifugando a 13.000 x g por 10 min. O segundo extrato foi obtido, juntando-o ao primeiro extrato.

Transferiu-se o extrato (lipídio dissolvido em clorofórmio) para um balão, previamente seco e pesado. Evaporou-se o excesso de solvente em evaporador rotatório a 75°C e 40 rpm. Ao final, secou-se o balão em estufa com recirculação de ar a 50°C (Quimis, modelo Q314M242, Brasil) até atingir massa constante, obtendo-se o conteúdo lipídico presente em cada uma das biomassas avaliadas. Através da Equação 1, foi possível quantificar o conteúdo lipídico.

Conteúdo Lipídico (%) = $\frac{\text{massa}_{\text{Balão+Lipídios}}(g) - \text{massa}_{\text{Balão}}(g)}{\text{massa}_{\text{Biomassa}}(g)} \times 100$ (1)

3.5. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A esterificação foi realizada pelo método adaptado de Metcalfe, Schmitz e Pelka (1996). Na fração lipídica foi determinada a composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa e para separar e quantificar a mistura de ácidos graxos foi empregado cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010 Plus, Japão), equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar RTX®-1 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm) e detector por ionização de chama (DIC). O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260°C, sendo o volume injetado de 1 µL. As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50°C, elevando-se para 200°C, em uma taxa de 6°C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de 2°C.min⁻¹ até 240°C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação dos ácidos graxos, sendo quantificados pela normatização das áreas.

3.6. PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIODIESEL

A predição das propriedades do biodiesel que pode ser obtido a partir dos óleos microalgais foi realizada a partir das propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos que compõem os lipídios microalgais produzidos nesse trabalho, tendo como base a Tabela 1, os procedimentos propostos por Raimondi et al. (2014) e Duarte e Maugeri (2014).

Para determinar as propriedades individuais de cada metil éster de ácido graxo que compõe o biodiesel, foram utilizadas as Equações 2, 3, 4 e 5, estabelecidas por Ramírez-Verduzco, Rodríguez-Rodríguez e Jaramillo-Jacob (2012).

(3)

$$CN_i = -7.8 + 0.302 \cdot M_i - 20 \cdot D_i \tag{2}$$

$$\rho_i = 0.8463 + \frac{1.5}{M_i} + 0.0118 \cdot D_i$$

 $\ln(v_i) = -12,503 + 2,496 \cdot \ln(M_i) - 0,178 \cdot D_i$ (4)

$$\Delta H_{ci} = 46,19 - \frac{1794}{M} - 0,21 \cdot D_i \tag{5}$$

Sendo:

 M_i : Massa molar do metil éster de ácido graxo (g mol⁻¹); D_i : Número de ligações duplas presentes no ácido graxo; CN_i : Número de cetano do ácido graxo; ρ_i : Massa específica do ácido graxo (kg m⁻³); v_i : Viscosidade cinemática do ácido graxo (mm² s⁻¹); ΔH_{ci} : Calor de combustão do ácido graxo (MJ kg⁻¹);

As propriedades do biodiesel estimadas foram: massa específica, viscosidade cinemática, índice de saponificação, índice de iodo, número de cetano e calor de combustão. A predição dessas propriedades se deu através das equações empíricas 6, 7, 8, 9, 10 e 11, de acordo com os trabalhos de Raimondi et al. (2014) e Khot et al. (2012).

$\rho_{mix} = \sum_i (c_i * \rho_i)$	(6)
$v_{mix} = \sum_i (c_i * v_i)$	(7)
$IS_{mix} = \sum_i (c_{i\%} * 560) / M_i$	(8)
$II_{mix} = \sum_i (c_{i\%} * D_i * 254) / M_i$	(9)
$CN_{mix} = [1,608 * \sum_{i} (c_i * CN_i)] - 6,747$	(10)
$\Delta H_{mix} = 49,43 - (0,041 * SN_{mix} + 0,015 * II_{mix})$	(11)
Sendo:	

mix: Mistura de ésteres de ácido que compõe o lipídio;

 ρ_{mix} : Massa específica do biodiesel (kg m⁻³);

 c_i : Composição relativa em massa (fração mássica) dos ácidos graxos individuais que compõem o lipídio;

 $c_{i\%}$: Composição relativa em massa (%) dos ácidos graxos individuais que compõem o lipídio;

 v_{mix} : Viscosidade cinemática do biodiesel (mm² s⁻¹);

IS_{mix}: Índice de saponificação (mg KOH/g);

 II_{mix} : Índice de iodo (g₁₂ 100g⁻¹);

CN_{mix}: Número de cetano;

 ΔH_{mix} : Calor de combustão (MJ kg⁻¹);

Propriedade	Símbolo	Unidade	C12:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:2n6t	C18:3n6	C18:3n3	C18:1n9c	C20:0	C20:1n9
Dupla ligação	Di	-	0	1	0	1	2	3	3	1	0	1
Massa molar	M_{i}	g mol ⁻¹	214,3	240,4	270,5	268,4	294,5	292,5	292,5	296,5	326,2	324,5
Número de cetano	CN_i	-	56,9	44,8	73,9	53,3	41,1	20,5	20,5	61,7	90,8	70,2
Massa específica	$ ho_i$	Kg m ⁻³	869,1	878,4	864,4	876,3	886,5	898,4	898,4	874,6	861,3	873,2
Viscosidade cinemática	ν_i	$mm^2 s^{-1}$	2,45	2,72	4,37	3,59	3,78	3,11	3,11	4,60	7,00	5,76
Calor de combustão	ΔH_{i}	MJ kg ⁻¹	37,82	38,51	39,56	39,30	39,68	39,42	39,42	39,93	40,70	40,45

Tabela 1-Valores de propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos relacionados ao perfil de ácidos graxos da microalgaC. calcitrans

100

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 95% de confiança ($p \le 0.05$), ou Teste t a 95% de confiança, conforme a comparação realizada entre as diferentes condições experimentais testadas. Para tal, foi utilizado o Statistica 5.0 (Stat Soft Inc., EUA).

5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5.1. CINÉTICA DO ACÚMULO DE LIPÍDIOS E BIOMASSA

Na Figura 1A é mostrado o crescimento celular ao longo do tempo da microalga *C. calcitrans* em diferentes condições de cultivo e na Figura 1B a cinética do acúmulo de lipídos. Foi verificado para a condição 1 (Figura 1B) que não houve diferenças significativas até o 8° dia no conteúdo lipídico, entretanto observou-se uma redução significativa no 10° dia $(35,3 \pm 3,3\%)$ comparado com o 6° dia de cultivo $(43,2 \pm 1,2\%)$. Os lipídios são produzidos intracelularmente pelas microalgas e sua composição pode variar em diferentes fases do crescimento e no período de respiração da fase escura da fotossíntese (LIN e WU, 2015; LV et al., 2010, LEE et al., 2011). No 6° dia de cultivo a biomassa atingiu 0,63 ± 0,02 g L⁻¹, ocorrendo a diminuição para 0,37 ± 0,04 g L⁻¹ no 10° dia de cultivo (Figura 1A).

Na condição 2 não foram observadas diferenças significativas ao longo do tempo, mas este fato pode estar associado aos maiores desvios padrão observados nestes cultivos, sendo que os valores médios do conteúdo lipídico oscilaram entre $35,6 \pm 3,7\%$ (3° dia) e $40,7 \pm 3,9 \%$ (10° dia). Nesta condição, também não foram observadas diferenças significativas para a biomassa até o 8° dia de cultivo (Figura 1A) atingindo $1,64 \pm 0,04$ g L⁻¹, e no 10° dia de cultivo ocorreu o decréscimo da biomassa para $1,36 \pm 0,04$ g L⁻¹, não mostrando diferenças quando compararos ao 3° e 6° dia de cultivo, isto também devido aos maiores desvios observados nestes experimentos.

Quando as duas condições de cultivo testadas foram comparadas quanto ao conteúdo lipídico obtido no mesmo tempo de cultivo, não foram observadas diferenças significativas entre si, porém a condição 2 resultou em maior produção de biomassa em todos os tempos de cultivo analisados. Desta forma, com o ciclo de fotoperíodo 12C:12E h e 5,61 g L⁻¹ de GR, a microalga foi capaz de produzir maior quantidade de biomassa, enquanto que com o ciclo de fotoperíodo 24C:0E h e 3,37 g L⁻¹ de GR, o tempo de exposição à luz pode ter sido excessivo, ocasionando fotoinibição, dificultando o crescimento celular.


Figura 1 - Acúmulo de lipídios e biomassa ao longo do cultivo de C. calcitrans

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p≥0,05) ao longo do tempo para a mesma condição.

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p≥0,05) entre as condições para o mesmo tempo.

***Condição 1** - Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃ e temperatura de 30°C.

***Condição 2 -** Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L⁻¹ de NaNO₃ e temperatura de 30°C.

5.2. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O perfil de ácidos graxos em termos de composição de AGS, AGM e AGPI em microalgas pode ser alterado devido às diferenças nos meios de cultura, condições de cultivo e idade da cultura (PRATIWI et al., 2009).

Na condição 1, verifica-se que maior porcentagem de AGS foi atingida em 8 e 10 dias, com 18,4 \pm 3,7% e 19,4 \pm 1,4%, respectivamente, não diferindo significativamente entre si (Figura 2), enquanto que a condição 2, nos mesmos tempos, resultou em 10,5 \pm 1,07% e 10,0 \pm 1,47% de AGS, respectivamente (Figura 2). Comparando as condições nestes mesmos tempos, diferença significativa quanto ao percentual de AGS foi observada. Nos

tempos de 3 e 6 dias, o acúmulo de AGS foi menor quando comparado com os tempos de 8 e 10 dias, para as duas condições de cultivo testadas.

Dentre os AGS produzidos, destaca-se o ácido palmítico (C16:0). Este ácido é o precursor dos outros ácidos graxos de cadeias longas saturados e insaturados. Este ácido graxo é característico das *Bacillariophyceae*, que apresentam geralmente elevado teor de ácido palmítico (LEE et al.; 2011; SERASPE et al.; 2014). A formação de ácido palmítico está relacionada ao armazenamento de energia celular. Portanto, este ácido é sempre encontrado em todos os estágios de crescimento. Observando a Tabela 2, na condição 1 o maior percentual de ácido palmítico foi obtido em 10 dias de cultivo (17,2 ± 1,5%), não diferindo significativamente de 8 dias de cultivo (16,0 ± 4,3%), entretanto em 8 dias de cultivo a biomassa obtida foi inferior à obtida em 6 e 3 dias de cultivo (Figura 1). Estes valores de ácido palmítico foram superiores aos obtidos nos mesmos tempos de cultivo para a condição 2 (com 7,7 ± 1,0% e 7,5 ± 1,5%, respectivamente). E na condição 2, maior biomassa foi atingida em 8 dias (1,64 ± 0,04 g L⁻¹), quando comparada com 10 dias (1,36 ± 0,04 g L⁻¹) e com a condição 1 nos mesmos tempos de cultivo (0,43 ± 0,06 g L⁻¹ e 0,37 ± 0,04 g L⁻¹), respectivamente (Figura 1).





*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p≥0,05) ao longo do tempo para a mesma condição.

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p≥0,05) entre as condições para o mesmo tempo.

***Condição 1** – Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), 3,37 g L⁻¹ GR, 0,08 g L⁻¹ silicato de sódio, 0,0002 g L⁻¹ nitrato de sódio e temperatura de 30°C.

***Condição 2** – Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), 5,61 g L⁻¹ GR, 0,14 g L⁻¹ silicato de sódio, 0,0001 g L⁻¹ nitrato de sódio e temperatuara de 30°C.

Quanto aos AGM, em 8 e 10 dias de cultivo foram obtidos os maiores percentuais de AGM para a condição 1, que foram de $58,1 \pm 1,23\%$ e $57,6 \pm 0,9\%$, respectivamente, diferindo dos valores obtidos em 3 e 6 dias de cultivo. Para a condição 2, os valores foram de $64,6 \pm 6,3\%$ e $63,4 \pm 4,7\%$, respectivamente, não mostrando diferenças significativas entre si, entretanto sendo menores que os encontrados em 6 dias de cultivo (Figura 2).

Nos AGM, a maior produção foi dos ácidos tetradecenoico (C14:1) e palmitoleico (C16:1). Para a condição 1, o ácido tetracenoico (C14:1) foi obtido em maior proporção nos tempos de 8 e 10 dias, com 24,7 \pm 2,8% e 25,3 \pm 3,3% (Tabela 2), enquanto que o ácido palmitoleico (C16:1) não mostrou diferenças significativas para todos os tempos analisados (3, 6, 8 e 10 dias), com valores de 28,5 \pm 2,2%, 29,0 \pm 1,1% 28,6 \pm 2,5% e 27,5 \pm 2,8%, respectivamente (Tabela 2). Para a condição 2, o ácido tetradecenoico (C14:1) passou de 14,2 \pm 5,7% (tempo 3 dias) para 30,1 \pm 3,6%, (tempo 6 dias), sendo que os tempos de 8 e 10 dias não diferiram estatisticamente do tempo 6 dias. A produção do ácido palmitoleico (C16:1) não mostrou diferenças significativas nos tempo 3 e 6 dias, com 58,5 \pm 3,8% e 53,4 \pm 3,0%, respectivamente, porém decresceram para 41,9 \pm 0,5% (8 dias) e 41,7 \pm 3,8% (10 dias) (Tabela 2).

Quando comparada as condições 1 e 2 (Tabela 2), verifica-se que a produção do ácido tetradecenoico (C14:1) não mostrou diferenças significativas nos 8° e 10° dias de cultivo, enquanto que para o ácido palmitoleico (C16:1) a condição 2 proporcionou maiores teores em todos os tempos analisados, mostrando-se a condição 2 mais interessante para a produção desse ácido (praticamente o dobro) em relação à condição 1.

Em relação aos AGPI, verifica-se que a condição 1 proporcionou maiores conteúdos de AGPI nos tempos 3 e 6 dias, que não diferiram entre si, e nesses tempos os percentuais de AGPI foram de $45,3 \pm 6,1\%$ e $44,8 \pm 3,2\%$ (Figura 2). Na condição 2, ao contrário, maiores valores foram encontrados em 8 e 10 dias de cultivo ($24,8 \pm 5,5$ e $26,6 \pm 3,45$, respectivamente).

Composição relativa de ácidos graxos (%)								
Condição 1					Condição 2			
Ácido graxo	3d	6d	8d	10d	3d	6d	8d	10d
Ácido graxo saturado (AGS	S)							
C12:0 (Láurico)	$1,6 \pm 0,4^{a, B}$	$1,7\pm0,3^{a,B}$	$1,4\pm0,2$ $^{\rm a,\ B}$	$1,1 < 0,01^{a, B}$	$2,8 \pm 0,1^{b,A}$	$3,5\pm0,5$ ^{a, A}	$2,8\pm0,4^{b,A}$	$2,5\pm0,1^{\rm \ b,\ A}$
C16:0 (Palmítico)	$6,7 \pm 1,4^{\text{ c, A}}$	$9,8\pm0,6$ b, c, A	$16,0 \pm 4,3^{a,b,A}$	$17,2 \pm 1,5^{a, A}$	$2,6\pm0,4$ ^{b, B}	$1,9\pm0,5~^{b,~B}$	7,7 \pm 1,0 ^{a, B}	$7{,}5\pm1{,}5$ a,B
C20:0 (Araquídico)	-	-	$1,0\pm0,4$ ^a	$1,1\pm0,2$ a	-	-	-	-
Ácido graxo monoinsaturad	do (AGM)							
C14:1 (Tetradecenoico)	$14,0\pm 6,2^{b,A}$	$12,0 \pm 0,9^{b, B}$	$24,7\pm2,8^{\ a,A}$	$25,3 \pm 3,3^{a,A}$	$14,2 \pm 5,7^{\text{ b, A}}$	$30,1 \pm 3,6^{a, A}$	$22,7 \pm 6,1^{a, b, A}$	$21,7 \pm 2,1^{a, b, A}$
C16:1 (Palmitoleico)	$28,5\pm2,2^{\ a,B}$	$29,0\pm1,1^{\text{ a, B}}$	$28{,}6\pm2{,}5^{\text{ a, B}}$	$27,5\pm2,8$ ^{a, B}	$58,5 \pm 3,8^{a, A}$	$53,4 \pm 3,0^{a, A}$	$41,9 \pm 0,5^{b,A}$	$41,7 \pm 3,8^{b,A}$
C18: 1n9c (Oleico)	$3,9 \pm 3,6^{a}$	$2{,}7\pm0{,}5$ $^{\rm a}$	$3,5\pm0,6$ ^a	$3,6\pm0,5$ a	-	-	-	-
C20:1n9 (Eicosenoico)	-	-	$1,1 \pm 0,6^{a}$	$1,1\pm0,3$ ^a	-	-	-	-
Ácido graxo poli-insaturado (AGPI)								
C18:2n6t (Linoleico)	$12,0\pm2,8$ ^{a, A}	$11,8 \pm 1,4^{a,b,A}$	$8,6\pm 1,4^{a,b,A}$	7,4 \pm 0,7 ^{b, A}	$3,1\pm0,1$ ^{b, B}	$2,0\pm0,2^{\text{ b, B}}$	$6,5 \pm 2,6^{a,b,A}$	$7{,}8\pm2{,}3$ $^{\mathrm{a,A}}$
C18:3n6 (γ - linolênico)	$27,2\pm5,4^{a,A}$	$27,2\pm4,2^{\text{ a, A}}$	$11,5 \pm 2,1^{b,A}$	$11,8 \pm 2,1$ ^{b, A}	$4,7 \pm 0,8^{b,B}$	$2,0\pm0,7~^{b,~B}$	$12,5 \pm 2,7$ ^{a, A}	$12,7 \pm 4,5^{a, A}$
C18:3n3 (a – linolênico)	$6,1\pm0,6$ $^{a,\ B}$	$5,8\pm0,3$ $^{a,\ B}$	$3,6\pm0,4^{\text{ b, B}}$	$3,9\pm0,4^{\text{b,B}}$	$11,8 \pm 0,5^{a, A}$	$6,7 \pm 0,5^{b,A}$	$5,8\pm0,4^{\text{ b, a, A}}$	6,1 ±1,3 ^{b, A}

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos (%) ao longo do cultivo de C. calcitrans em diferentes condições

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p≥0,05) entre os tempos de cultivo para o mesmo ácido graxo, na mesma condição de cultivo.

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as condições de cultivo, para o mesmo ácido graxo, no mesmo tempo de cultivo. - Não detectado

***Condição 1** - Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃ e temperatura de 30°C.

*Condição 2 - Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L -¹ de NaNO₃ e temperatura de 30°C. Para os AGPI, observa-se na Tabela 2, para a condição 1, que os maiores percentuais foram obtidos nos tempos de 3 e 6 dias para todos AGPI identificados, sendo eles: o ácido linoleico (C18:2 n6t), com 12,0 ± 2,8% (3 dias) e 11,8 ± 1,4% (6 dias); o ácido γ -linolênico (C18:3n6), com 27,2 ± 5,4% e 27,2 ± 4,2%, respectivamente; e o ácido α -linolênico (C18:3n3), com 6,1 ± 0,6% e 5,8 ± 0,3%, respectivamente. Esses tempos de cultivo correspondem àqueles em que foram alcançadas maiores biomassas nesta condição de cultivo (Figura 1). Desta forma, em 6 dias de cultivo, esta biomassa pode constituir importante fonte de ácido γ -linolênico. Para a condição 2 ,os ácidos linoleico (C18:2 n6t) e γ -linolênico (C18:3n6) foram produzidos em maiores proporções nos tempos maiores, com $6,5 \pm 2,6\%$ e 7,8 ± 2,3% para o ácido linoleico (C18:2 n6t), e 12,5 ± 2,7% e 12,7 ± 4,5% para o ácido γ -linolênico (C18:3n6), nos tempos de 8 e 10 dias, respectivamente. Para o ácido α -linolênico (C18:3n3), o maior acúmulo foi de 11,8 ± 0,5% em 3 dias de cultivo.

A biossíntese de AGPI de cadeia longa é iniciada a partir de ácido oleico (18:1), sendo que este pode atuar como substrato para a formação do ácido graxo de cadeia longa, que envolve uma série de processos de dessaturação e alongamento da cadeia de carbono al., catalisada enzimas dessaturase e elongase (PRATIWI pelas et 2009; BÉLIGON et al., 2016). Na sequência de formação de AGPI, o ácido linoleico (C18:2) atua como precursor dos ácidos graxos ômega 6 (ω6) e como substrato para a formação do ácido linolênico (18:3) que por sua vez é precursor da síntese de ácidos graxos ômega 3 (ω3). Foi observada que a biossíntese de ácidos graxos na condição 1, à medida que diminui a proporção do ácido oleico, tem-se o aumento do ácido linoleico e consequentemente as devidas proporções dos ácidos α e γ -linolênico ao longo do tempo de cultivo de C. calcitrans (Tabela 2).

Lee et al. (2011) avaliaram cinco espécies de microalga para a produção de lipídios utilizando o meio f/2 e ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, incluindo *C. calcitrans*, e verificaram que as 5 microalgas mostraram aumento do acido palmítico durante a fase estacionária, sugerindo que a microalga utiliza os ácidos graxos insaturados como fonte de energia e acumula ácido graxo saturado quando há deficiência de nutrientes no meio. Tal afirmativa está de acordo com o comportamento da microalga *C. calcitrans* demonstrado na condição 1 (Tabela 2), em que pode se observar que a partir do 8º dia de cultivo há o aumento nas proporções de AGS e diminuição de AGPI.

Os resultados obtidos são bastante promissores, em particular os obtidos na condição 1, já que os AGS e AGMI são adequados para a conversão em biodiesel (LEE et al., 2011; GAO;YANG; WANG, 2013), enquanto que os AGPI, como linoleico

(C18:2n6t) e γ -linolênico (C18:3n6), conhecidos como ácidos graxos essenciais (ω 6 e ω 3), não podem ser sintetizados pelo organismo humano, sendo importantes para a alimentação.

5.3. A PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIODIESEL

Para a predição das propriedades do biodiesel, embora a Tabela 3 apresente os resultados das propriedades estimadas do biodiesel para o perfil de ácidos graxos produzidos ao longo do tempo pela microalga *C. calcitrans* nas condições 1 e 2, e a maior parte dos parâmetros estarem dentro dos limites estabelecidos pelas normas ASTM-D6751 (EUA), EM 14213 e EM 14214 (Europa) e ANP (Brasil) para comercialização do biodiesel, foi estabelecido o tempo de 8 dias de cultivo para a discussão dos resultados em função das maiores proporções observadas para AGS e AGM.

Com os dados obtidos do perfil de ácidos graxos para as condições 1 e 2, no tempo de 8 dias de cultivo, através da Tabela 2, e com as equações empíricas (6 a 11) e utilizando o princípio da regra das misturas, foi possível predizer as propriedades do biodiesel, que servem como parâmetros importantes para prever a qualidade do biocombustível (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012; DUARTE; MAUGERI, 2014; CERIANE et al., 2007). A Tabela 3 mostra os valores limites de propriedades do biodiesel estabelecidos pelas normas vigentes ASTM-D6751 (EUA), EM 14213 e EM 14214 (Europa) e ANP (Brasil) para comercialização do biodiesel e apresenta os resultados das propriedades estimadas do biodiesel para os lipídios produzidos ao longo do tempo pela microalga *C. calcitrans* nas condições1 e 2.

O número de cetano (CN) é um número adimensional para o diesel assim como o índice de octano é para a gasolina, estando associado com o tempo de atraso de ignição, isto é, o tempo entre a injeção de combustível e o início da ignição. Quanto maior o NC de um combustível, menor é o atraso entre a sua injeção e o início da combustão, sendo um dos mais importantes indicadores da qualidade do biodiesel. Verifica-se que o valor do NC da condição 1 (46,63 \pm 0,89) está dentro dos limites padrões das normas ASTM D6751 e da ANP 255/2003 que, de acordo com a Tabela 3, requerem um CN mínimo de 45 (Brasil) e 47 (EUA). Na condição 2 foi estimado o valor de CN de 42,36 \pm 0,61, portanto um pouco abaixo do recomendado pelas normas citadas. Este resultado esta diretamente ligado às maiores frações de AGS obtidos pela *C. calcitrans* na condição 1 de cultivo.

Tempo	Condição 1	Condição 2	Norm	a*	
	Núm	ero de cetano	ASTM D6751	Min 47	
3	$46,62 \pm 0,89^{a,A}$	$42,36 \pm 0,61^{a,B}$	EM 14213		
6	$46,62 \pm 0,89^{a,A}$	$42,36 \pm 0,61^{a,B}$	EM 14214	Min 51	
8	$46,63 \pm 0,89^{a,A}$	$42,36 \pm 0,61^{a,B}$	ANP 255/2003	Min 45	
10	$46,62 \pm 0,89^{a,A}$	$42,36\pm 0,61^{a,B}$			
	Massa e	specífica (kg m ⁻³)			
3	$884{,}54\pm0{,}64^{\rm \ a,\ A}$	$859,68 \pm 34,78^{a, A}$	ASTM D6751		
6	$883,77 \pm 1,22^{a, A}$	$878,63 \pm 0,03^{a, B}$	EM 14213	860 - 900	
8	$881,19 \pm 3,91$ ^{a, A}	$880,14 \pm 1,79^{a,A}$	EM 14214	860 - 900	
10	860,11 ± 32,07 ^{a, A}	$880,67 \pm 0,48^{\text{ a, A}}$	ANP 255/2003		
	Viscos	sidade (mm ² s ⁻¹)			
3	$3,\!66\pm0,\!01^{a,A}$	$3,36 \pm 0,01^{a, B}$	ASTM D6751	1,6-6,0	
6	$3,\!66\pm0,\!01^{a,A}$	$3,36 \pm 0,01^{a, B}$	EM 14213	3,5 - 5,0	
8	$3{,}66\pm0{,}01^{a,\rm A}$	$3,36 \pm 0,01^{a, B}$	EM 14214	3,5 - 5,0	
10	$3,\!66\pm0,\!01^{a,A}$	$3,35 \pm 0,01^{a, B}$	ANP 255/2003		
	Índice de	e iodo (g ₁₂ 100 g ⁻¹)			
3	$152,54 \pm 8,11^{a, A}$	$118,90 \pm 4,42^{a, b, B}$	ASTM D6751		
6	$148,80 \pm 7,2^{a, A}$	$108,63 \pm 0,34$ ^{b, B}	EM 14213	Max 130	
8	$111,61 \pm 6,94$ ^{b, A}	122,65 ± 5,43 ^{a, A}	EM 14214	Max 120	
10	$110,29 \pm 5,10^{\text{ b, B}}$	$124,69 \pm 3,64$ ^{a, A}	ANP 255/2003		
	Índice de sapo	onificação (mg KOH/g)			
3	$204,16 \pm 3,02$ ^{b, A}	$205,19 \pm 9,15$ a, A			
6	$203,92 \pm 0,81$ ^{b, B}	$216,04 \pm 0,90$ a, A			
8	$209,99 \pm 0,95$ ^{a, A}	211, $09 \pm 2,39^{a, A}$			
10	209,47 \pm 0,82 $^{\rm a,A}$	$210,47 \pm 1,00^{\text{ a, A}}$			
Calor de combustão (MJ kg ⁻¹)					
3	$38,77 \pm 0,04$ ^{b, A}	$39,23 \pm 0,44$ ^{a, A}	ASTM D6751		
6	$38,83 \pm 0,07$ ^{b, A}	$38,94 \pm 0,03$ ^{a, A}	EM 14213	Min 35	
8	$39,14 \pm 0,06^{\text{ a, A}}$	$38,93 \pm 0,02^{\ a, B}$	EM 14214		
10	$39,18 \pm 0,06^{\text{ a, A}}$	$38,93 \pm 0,01$ ^{a, B}	ANP 255/2003		

 Tabela 3 - Valores de propriedades estimadas do biodiesel para as condições 1 e 2 ao longo do tempo para a microalga C. calcitrans.

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) ao longo do tempo para a mesma condição e propriedade estimada.

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p≥0,05) entre as condições de cultivo para cada propriedade estimada e tempo fixo.

*Condição 1 - Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração de 3,37 g L^{-1} de GR, concentração de 0,08 g L^{-1} de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L^{-1} de NaNO₃ e temperatura de 30°C.

***Condição 2** - Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração de 5,61 g L^{-1} de GR, concentração de 0,14 g L^{-1} de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L^{-1} de NaNO₃ e temperatura de 30°C.

*ASTM D6751 - Norma vigente nos EUA

* EM 14213 e EM 14214 - Normas vigentes na Europa

*ANP 255/2003 – Norma vigente no Brasil

Embora os índices de iodo para ambas as condições de cultivo estejam dentro dos limites estabelecidos para esse parâmetro, a condição 1, com $111,61 \pm 6,94$ g₁₂ $100g^{-1}$,

resultaria em um biodiesel menos suscetível à oxidação pelo oxigênio em função das maiores proporções de AGS ($18,4 \pm 1,6\%$), quando comparada à condição 2 ($10,5 \pm 1,1\%$ de AGS), conforme Figura 1. O índice de iodo refere-se à tendência de biodiesel para reagir com oxigênio à temperatura ambiente, está relacionado com a presença de duplas ligações na cadeia de alguns compostos graxos. O baixo índice de iodo indica menor susceptibilidade de oxidação pelo oxigênio (DUARTE; MAUGERI, 2014).

A viscosidade cinemática para o biodiesel resultante da condição 1 foi de $3,66 \pm 0,01 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, e para condição 2 foi de $3,36 \pm 0,01 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, esta última se enquadrando apenas na norma ASTM D6751 (Tabela 3). Tal propriedade está relacionada à resistência do fluido ao escoamento, sendo importante para garantir o funcionamento dos sistemas de injeção e bombas de combustíveis (ZUNIGA et al., 2012).

A massa específica do biodiesel está diretamente ligada com a estrutura molecular das suas moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquiléster, maior será a massa específica. No entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula (LÔBO; FERREIRA, 2009). Neste trabalho, a massa específica não mostrou diferenças significativas para ambas as condições de cultivo, sendo a massa específica obtida para a condição 1 de 881,19 \pm 3,91 kg m⁻³ e para a condição 2 de 880,14 \pm 1,79 kg m⁻³. Com relação as porcentagens de AGM, estes não mostraram diferenças significativas entre as condições 1 e 2, apresentando 58,1 \pm 1,23% e 64,6 \pm 6,3%, respectivamente, (Figura 2). Para os AGPI, também não foram encontradas diferenças estatisticamente, sendo a condição 1 com 23,8 \pm 2,2% e a condição 2 com 24,8 \pm 5,5% (Figura 2).

Para o índice de saponificação, não há valores limites, no entanto altos índices de saponificação podem prejudicar o rendimento da reação pela formação de sais de ácidos graxos promovidas pelo catalisador básico e presença de água na matéria prima. Quanto maior o índice de saponificação, maior a quantidade de catalisador necessário. Neste trabalho, o índice de saponificação das diferentes condições de cultivo não foram diferentes entre si.

O calor de combustão para a condição 1 foi $39,19 \pm 0,07$ MJ kg⁻¹ e para a condição 2 foi $38,93 \pm 0,01$ MJ kg⁻¹, valores dentro dos padrões estabelecidos pela norma EM 14213, que é de no mínimo 35 MJ kg⁻¹.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho o acúmulo de lipídios por *C. calcitrans* em diferentes condições de cultivo foi avaliado. Verificou-se que o conteúdo lipídico não variou ao longo dos tempos de cultivo analisados, bem como entre as condições de cultivo. Entretanto o perfil de ácidos graxos mudou, tanto em relação ao modo de cultivo como em relação ao tempo de cultivo, com variações expressivas nos percentuais de AGM, AGS e AGPI, bem como nos ácidos graxos individuais, observando-se a ocorrência principalmente dos ácidos palmítico (C16:0), tetradecenoico (C14:1), palmitoleico (C16:1) e γ -linolênico (C18:3n6).

Este fato implica que a mudança das condições de cultivo, incluindo o tempo de cultivo, pode resultar em biomassa com características diferenciadas, que pode, por exemplo, ser aplicada como fonte do ácido graxo essencial γ-linolênico e fonte de ácido palmitoleico, importantes na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos.

No caso específico do biodiesel, a condição 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio e concentração de 0,0002 g L⁻¹ de NaNO₃) para um tempo de cultivo de 8 dias, proporcionou biomassa com proporções interessantes de AGS e AGM, o que resultaria, de acordo com a predição das propriedades físico-químicas, em um biodiesel que atenderia as exigências das normas brasileira, europeia e americana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETR[OLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: http://www.anp.gov.br. Acesso em: 22 de jul. 2016, 10:54:07.

BÉLIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 35 - 42, 2016.

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

CERIANI, R.; GONÇALVES, C. B.; RABELO, J.; CARUSO, M.; CUNHA, A. C. C.; CAVALERI, F. H.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. Group contribution model for predicting viscosity of fatty compounds. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 965 - 972, 2007. CHISTI, Y. **Raceways-based production of algal crude oil**. In: Posten, C., Walter, C. (Eds.). Microalgal biotechnology: Potential and production. De Gruyter, Berlin, p. 113 - 146, 2012.

DUARTE, S. H.; MAUGERI, F. Prediction of quality properties for biodiesel production by oleaginous yeast cultivated in pure and raw glycerol. **Chemical Engineering Transactions**, v.37, p.463 - 468, 2014.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484 – 491, 2013.

HEMALATHA, A.; KARTHIKEYAN, P.; MANIMARAN, K. Effect of temperature on the growth of marine diatom, *Chaetoceros simplex* (Ostenfeld, 1901) with different nitrate: Silicate concentrations. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, p. S1817 - S1821, 2012.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S.; PANT, A.; CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial Cell Factories**, v. 11:71, p. 1 - 13, 2012.

LEE, S.; GO, S.; JEONG, G.; KIM, S. Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 561 - 566, 2011.

LI, S.; XU, J.; CHEN, J.; CHEN, J.; ZHOU, C.; YAN, X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. **Aquaculture**, n. 428 - 429, p. 104 - 110, 2014.

LIN, T., WU, J. Effect of sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 100 - 107, 2015.

LV, X.; ZOU, L.; SUN, B.; WANG, J.; SUN, M. Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 391, p. 73 - 83, 2010.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova,** v. 32, n. 6, p. 1596 - 1608, 2009.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and modified Bligh & Dyer extraction methods. Journal of Food Composition and Analysis, v. 14, p. 93 - 100, 2001.

METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514 - 515, 1966.

NOGUEIRA, D. A. **Cultivo mixotrófico de diatomáceas utilizando glicerina como fonte de carbono.** 2013.102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

PRATIWI, A. R.; SYAH, D.; HARDJITO, L.; PANGGABEAN, L. M. G.; SUHARTONO, M. T. Fatty acid synthesis by indonesian marine diatom, *Chaetoceros gracilis*. Journal of **Biosciences**, v. 16, n. 4, p. 151 - 156, 2009.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, p. 102 - 111, 2012.

RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M. M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: New perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, v,13, p. 1 - 11, 2014.

SERASPE, E. B.; GABOTERO, S.; DE LA PEÑA, M. R.; PAHILA, I. G.; AMAR, E. C. Evaluation of dietary freeze-dried *Chaetoceros calcitrans* supplementation to control *Vibrio Harveyi* infection on *Penaeus monodon* juvenile. **Aquaculture**, v. 432, p. 212 - 216, 2014.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y.V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789 - 793, 2014.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, v. 25, p. 1 - 53, 1966.

YANG, M.; ZHAO, W.; XIE, X. Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. Acta Ecologia Sinica, v. 34, p. 311 - 319, 2014.

ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. M.; COIMBRA, J. S. R.; MARTINS, E. C. A.; SILVA, D. X.; ROMERO, J. T. Revisão: Propriedades físico-químicas do biodiesel. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 21, p. 55 - 72, 2011.

ARTIGO III

RUPTURA CELULAR DE *Chaetoceros calcitrans* POR MICRO-ONDAS E ULTRASSOM PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

RESUMO

Os métodos de ruptura celular vêm sendo investigados na extração de lipídios da biomassa de microalgas, uma vez que ao romper a parede celular do micro-organismo, os lipídios intracelulares têm sua extração facilitada, entretanto a demanda energética é importante para a escolha do método. Por outro lado, deve-se também considerar os solventes empregados tanto na ruptura quanto na extração lipídica, principalmente pelos problemas relacionados aos possíveis danos ambientais, fazendo com que seja preferível o uso de solventes que proporcionem menor toxidade e que sejam empregados em menores quantidades. Neste contexto, este trabalho investigou o efeito dos métodos de ruptura celular por micro-ondas e ultrassom e o efeito de diferentes misturas de solventes na extração de lipídios a partir da biomassa de Chaetoceros calcitrans obtida de cultivo mixotrófico em meio contendo glicerol residual como fonte de carbono adicional. Para a obtenção da biomassa, o cultivo Foi conduzido em estufa com fotoperíodo, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), aeração constante de 0,2 L min⁻¹, concentração inicial de biomassa de C. calcitrans de 0,55 g L⁻¹, temperatura de 30°C e ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro). Ao término do cultivo a biomassa foi liofilizada e posteriormente foram realizadas as rupturas, testando diferentes tempos de exposição ao micro-ondas (40, 105 e 300 s) e ao ultrassom (5, 10 e 20 min), sendo os lipídios extraídos pelo método de Bligh e Dyer. O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa. As duas técnicas de ruptura celular aplicadas à biomassa foram eficientes, a ruptura por ultrassom (5 min) resultando em $24.6 \pm 1.3\%$ de lipídios, e por microondas (40 s) resultando em $24.2 \pm 0.9\%$ de lipídios, não mostrando diferenças entre si, e nem em relação ao controle $(24,2 \pm 1,0\%)$. No entanto, o método por ultrassom ocasionou menor gasto de energia do que o por micro-ondas. Com relação ao perfil de ácidos graxos, os dois métodos de ruptura resultaram na mudança do perfil de ácidos graxos, com aumento nos percentuais de ácidos graxos saturados de 7,7% (controle) para 16,6% (micro-ondas) e 15,5% (ultrassom), e poli-insaturados de 12,8% (controle) para 22,8% (micro-ondas) e 21,8% (ultrassom), sendo que para os ácidos graxos monoinsaturados houve diminuição nos percentuais de 79,5% (controle) para 60,6% (micro-ondas) e 62,7% (ultrassom). Dentre os solventes utilizados para а extração de lipídios, os sistemas utilizando Etanol-Clorofórmio-Água (4:4:3,6 v/v) e Metanol-Diclorometano-Água (4:4:3,6 v/v) apresentaram maior extratibilidade, com 90,7% e 89,8%, respectivamente. Embora o sistema utilizando Etanol-Diclorometano-Água (1:1:2 v/v) tenha resultado em 54,9% de extratibilidade, este deve ser considerado quando se trata de produção em larga escala em função da diminuição das quantidades de solvente utilizados.

Palavras-chave: Ultrassom. Micro-ondas. Solventes. Microalgas.

ABSTRACT

Cell rupture of *Chaetoceros calcitrans* by micro-waves and ultrasound for lipid extraction

The cell disruption methods have been investigated in the lipid extraction of the microalgae biomass, since when breaking the cell wall of the microorganism, the intracellular lipids have their extraction easier, however the energy demand is important for the choice of method. On the other hand, it is also necessary to consider the solvents used in both the disruption and the lipid extraction, mainly due to the problems related to possible environmental damages, making it preferable to use solvents that provide less toxicity and are used in smaller quantities. In this context, this work investigated the effect of microwave and ultrasonic cell disruption methods and the effect of different solvent mixtures on lipid extraction from Chaetoceros calcitrans biomass obtained from mixotrophic culture in a medium containing crude glycerol as a source of organic carbon. To obtain the biomass, the cultivation was performed an incubater with photoperiod with irradiance of 3000 lx (40.5 μ mol m⁻² s⁻¹), constant aeration of 0.2 L min⁻¹, initial biomass concentration of C. calcitrans of 0.55 g L⁻¹, temperature of 30°C and photoperiod regime 12L:12D h (Light:Dark). At the end of the cultivation the biomass was lyophilized and the disruption were performed, testing different exposure times to the microwave (40, 105 and 300 s) and the ultrasound (5, 10 and 20 min), and the lipids were extracted by the method of Bligh and Dyer. The fatty acid profile was determined by gas chromatography. The two techniques of cell disruption applied to biomass were efficient, the ultrasonic disruption (5 min) resulting in $24.6 \pm 1.3\%$ lipids, and the microwave disruption (40 s) resulting in $24.2 \pm 0.9\%$ lipids, showing no differences between them, nor with the control $(24.2 \pm 1.0\%)$. However, the ultrasonic methods caused less energy expenditure than the microwave. In relation to the fatty acid profile, the two methods of disruption resulted in a change in the fatty acid profile, with an increase in saturated fatty acids from 7.7% (control) to 16.6% (microwave) and 15.5% (ultrasound), and polyunsaturated fatty acids from 12.8% (control) to 22.8% (microwave) and 21.8% (ultrasound), while for monounsaturated fatty acids a significant reduction from 79.8% (control) to 60.6% (microwave) and 62.7% (ultrasound) was observed. Among the solvents used for the extraction of lipids, the systems using Ethanol-Chloroform-Water (4:4:3.6 v/v) and Methanol-Dichloromethane-Water (4:4:3.6 v/v) resulted an extractability of 90.7% and 89.8%, respectively. Although the system using Ethanol-Dichloromethane-Water (1:1:2 v/v) resulted in 54.9% of extractibility, this should be considered when dealing with large-scale production due to the decrease in solvent amounts used.

Keywords: Ultrasound. Microwave. Solvents. Microalgae.

1. INTRODUÇÃO

Hoje, há grande interesse na produção de microalgas em função do seu potencial para produção de uma variedade de metabólitos como carboidratos, lipídios, fármacos, pigmentos e enzimas. Além disso, podem ser aplicadas na produção de biodiesel (LEE et al., 2011).

Muitas pesquisas têm seu foco na produção de lipídios por microalgas uma vez que sua biomassa é rica em ácidos graxos saturados e insaturados (RYCKEBOSCH; MUYLAERT; FOUBERT, 2012; LI et al., 2014) e, dependendo das proporções destes, constitui uma fonte sustentável tanto para utilização em alimentos quanto para a indústria de biocombustíveis (SPOLAORE et al., 2006; LEE et al., 2011). No entanto, na obtenção de lipídios de microalgas é importante levar em consideração as técnicas de ruptura celular, uma vez que esses são produzidos intracelularmente. A escolha do método de ruptura celular deve manter a integridade da matéria prima de interesse, bem como deve ser considerada a demanda de energia envolvida (LEE et al., 2012; HALIM et al., 2012; VISWANATHAN et al., 2012). Outro aspecto que deve ser considerado na extração de lipídios é o solvente utilizado, pois frequentemente são considerados tóxicos ao ser humano, com danoso impacto ambiental (RYCKEBOSCH; MUYLAERT; FOUBERT, 2012; BALASUBRAMANIAN; DOAN; OBBARD, 2013).

Atualmente, várias técnicas de ruptura celular têm sido utilizadas, como ruptura por moinhos de bolas, autoclave, altas pressões, choque osmótico, ultrassom e micro-ondas (LEE et al, 2010; MA et al., 2014). As extrações assistidas por ultrassom e micro-ondas são conhecidas como técnicas eficientes de extração que reduzem o tempo de execução, possuem rendimentos crescentes e mantêm a qualidade dos extratos (LEE et al., 2010; MCMILLAN et al., 2013).

Na ruptura celular por ultrassom, através do fenômeno de cavitação, são formadas bolhas de cavitação que, ao se agitarem, explodem, aumentando a pressão e a temperatura do tecido adjacente, promovendo a ruptura da parede celular, liberando os compostos solúveis, aumentando a transferência de massa e facilitando o acesso de solvente ao conteúdo celular (CRAVOTTO et al., 2008; MA et al.; 2014). Na ruptura celular por micro-ondas, os sinais de corrente se alternam com frequências entre 0,3 e 300 GHz, transformando energia eletromagnética em calor com a polaridade dos compostos (PAN et al., 2016). A eficiência da ruptura por ultrassom e micro-ondas geralmente depende da estrutura, do conteúdo lipídico,

do material a ser analisado e das condições de micro-ondas e de ultrassom utilizadas (CRAVOTTO et al., 2008; LEE et al., 2010; MA et al., 2014).

Por outro lado, embora os métodos à base de clorofórmio e metanol terem sido desenvolvidos para a extração de lipídios neutros como triacilgliceróis (TAG), eles também são adequados para extrair os lipídios polares. Por possuírem as maiores eficiências de extração, os métodos de Bligh e Dyer (1959) e de Folch e Lees (1957) podem ser considerados padrões para a extração lipídica em laboratório. No entanto, a toxicidade do clorofórmio e do metanol é inadequada para a extração em larga escala, devido aos danos ambientais e à saúde, o que torna necessário e imprescindível comparar as eficiências de outros sistemas solventes (SHENG; VANNELA; RITTIMANN, 2011). Com este intuito, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de substituir os solventes convencionalmente utilizados na extração de lipídios (GRIMA et al., 1994; FAJARDO et al., 2007; SHENG; VANNELA; RITTIMANN, 2011; RYCKEBOSCH; MUYLAERT; FOUBERT, 2012).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as técnicas de ruptura celular por micro-ondas e ultrassom na recuperação de lipídios de *Chaetoceros calcitrans* cultivada em condições mixotróficas, comparando com o método convencional de Bligh e Dyer. Também busca-se avaliar diferentes misturas de solventes, visando diminuir a toxidade e o consumo dos mesmos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MICROALGA

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *Chaetoceros calcitrans*, cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia – UFBA (Salvador, Bahia).

2.2. GLICEROL RESIDUAL

O glicerol residual (82,09% de pureza) foi fornecido pela empresa BS BIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo/RS, sendo o coproduto da transesterificação de óleo de soja e metanol em catálise alcalina.

2.3. ÁGUA MARINHA

A água marinha foi coletada na Estação Marinha de Aquicultura (EMA - FURG), localizada no Balneário Cassino (Rio Grande-RS). Antes de ser adicionada ao meio de cultivo, a água foi filtrada e a salinidade foi ajustada em 28 ups (unidades por salinidade), utilizando salinômetro manual (Biobrix, Modelo 211, Brasil).

2.4. PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo foi utilizado o meio Conway (WALNE, 1966), constituído por água marinha natural com salinidade ajustada em 28 ups acrescida de solução principal (2 mL L⁻¹), solução de silicatos (2 mL L⁻¹) e solução de vitaminas (0,1 mL L⁻¹).

A solução principal foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): 45 C₁₀H₁₄O₈Na₂.2H₂O; 33,6 H₃BO₃; 100 NaNO₃; 0,36 MnCl₂.4 H₂O; 1,3 FeCl₃.6H₂O; 20 NaH₂PO₄.2H₂O; 1 mL de solução traços de metais contendo 21 ZnCl₂, 20 CoCl₂.6H₂O, 9 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O e 20 CuSO₄.5H₂O.

A solução de silicato de sódio adicionada ao meio continha 70 g L⁻¹ de Na₂OSiO₂.nH₂O.

A solução de vitaminas foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): 0,05 Vitamina B_{12} e 1 Vitamina B_1 .

2.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO

A microalga *Chaetoceros calcitrans* foi cultivada em frascos Elenmeyer de 2 L, contendo 1800 mL do meio Conway (WALNE, 1966), utilizando água marinha com ajuste de salinidade de 28 ups. Os frascos foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil) e ciclo 24C:0E h (Claro:Escuro), a iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min⁻¹, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para manter a esterilidade do ar. A temperatura foi mantida em 24 ± 1 °C. O cultivo foi interrompido quando a concentração de biomassa atingiu 0,55 g L⁻¹, conforme estabelecido por Nogueira (2013).

3. CULTIVO NOS FOTOBIORREATORES

3.1. INÓCULO

O volume de inóculo adicionado correspondeu a 10% do volume de meio estéril (SOARES, 2010), utilizando meio Conway.

3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

O micro-organismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 2 L, cada um contendo 1800 mL do meio Conway (Walne, 1966) com modificações, preparado com água marinha com ajuste de salinidade em 28 ups, acrescido de 5,61 g L⁻¹ de glicerol residual (GR) e com concentração da solução de silicatos modificada para 0,014 g L⁻¹ e concentração de nitrato de sódio modificada para 0,0001 g L⁻¹. Os frascos foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil), utilizado o ciclo de 12C:12E h (Claro:Escuro) e temperatura de 30°C, sendo que essas condições foram estabelecidas em função do perfil de ácidos graxos obtido no artigo II deste trabalho e pelo ciclo de fotoperíodo ser mais próximo das condições ambientais, diminuindo os gastos com energia elétrica. A iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irradiância de 3000 lx (40,5 µmol m⁻² s⁻¹), sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min⁻¹, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para manter a esterilidade do ar. A concentração inicial de biomassa para a microalga *C. calcitrans* foi de 0,55 g L⁻¹, conforme estabelecido por Nogueira (2013). Ao término de 10 dias de cultivo a biomassa foi liofilizada e moída.

4. **RUPTURA CELULAR**

4.1. RUPTURA CELULAR QUÍMICA

Como pré-tratamento da biomassa para a extração de lipídios, a ruptura celular foi realizada tomando-se uma porção de 0,3 g de biomassa liofilizada e adicionando 5 mL de HCl 2 M. Os lipídios foram extraídos e quantificados conforme Bligh e Dyer (1959), utilizando as quantidades sugeridas por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). Através da Equação 1, foi possível quantificar o conteúdo lipídico.

Conteúdo Lipídico (%) =
$$\frac{\text{massa}_{\text{Balão+Lipídios}}(g) - \text{massa}_{\text{Balão}}(g)}{\text{massa}_{\text{Biomassa}}(g)} \times 100$$
(1)

4.2. RUPTURA CELULAR POR MICRO-ONDAS

A etapa de ruptura química descrita na Figura 1 foi substituída pela que segue, como pré-tratamento da biomassa para a extração de lipídios. A ruptura celular foi realizada tomando-se uma porção de 0,3 g de biomassa liofilizada e adicionando 20 mL de água destilada, conforme descrito por Lee et al. (2010). Posteriormente a amostra foi submetida à radiação micro-ondas (Brastemp, modelo BMS35BBHNA, Brasil) com freqüência de 2,45 MHz e potência de 1,4 kW. Foram testados os tempos de exposição ao micro-ondas de 40, 105 e 300 s. Os lipídios foram extraídos e quantificados conforme Bligh e Dyer (1959), utilizando as quantidades de biomassa sugeridas por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001).

4.3. RUPTURA CELULAR POR ULTRASSOM

A etapa de ruptura química descrita na Figura 1 foi substituída pela que segue, Como pré-tratamento da biomassa para a extração de lipídios, a ruptura celular foi realizada tomando-se uma alíquota de 0,3 g de biomassa liofilizada e adicionando 20 mL de água destilada, conforme descrito por Lee et al. (2010). Posteriormente a amostra foi submetida à sonda ultrassônica (Cole Parmer, modelo CPX 130, EUA), com frequência de 20 kHz e potência de 130 W. Foram testados os tempos de exposição à sonda ultrassonica de 5, 10 e 20 min. Os lipídios foram extraídos e quantificados conforme Bligh e Dyer (1959), utilizando as quantidades de biomassa sugeridas por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). A Figura 1, mostra as etapas de extração lipídica utilizadas neste trabalho.



Figura 1 - Fluxograma das etapas e operações utilizadas na extração de lipídios

4.4. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A esterificação da fração lipídica extraída da biomassa foi realizada de acordo com o método adaptado de Metcalfe, Schmitz e Pelka (1996). Na fração lipídica foi determinada a composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa e para separar e quantificar a mistura de ácidos graxos foi empregado cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo 2010 Plus, Japão), equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar RTX®-1 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 μ m) e detector por ionização de chama (DIC). O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260°C, sendo o volume injetado de 1 μ L. As condições cromatográficas de separação foram: temperatura inicial da coluna 50°C, elevando-se para 200°C, em uma taxa de 6°C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de 2°C min⁻¹ até 240°C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação dos ácidos graxos, sendo quantificados pela normatização das áreas.

4.5. CÁLCULO DE CONSUMO DE ENERGIA

Para o cálculo do consumo de energia pelos tratamentos com micro-ondas e ultrassom foi utilizada a Equação 3 (HALLIDAY; HESNICK; WALKER, 2009), e para a conversão das unidades de massa, volume e energia foi utilizado o Sistema Internacional de Unidades e Medida (SI), atualizado pelo INMETRO através da Portaria nº 590, de 02 de dezembro de 2013.

 $E = P \times \Delta t$ Onde: E = energia (W.s);P = Potência (W);t = tempo (s). (3)

4.6. EFEITO DA MISTURA DE SOLVENTES

Foram estudadas diferentes misturas de solventes, conforme indicado na Tabela 1. Para os sistemas D, E, F, G e H, a extração de lipídios foi baseada nos volumes de solventes utilizados por Bligh e Dyer (1959), e para o sistema H, houve um tempo de repouso após a adição de hexano de 24 h para posterior extração de lipídios, conforme Viêgas (2010). Os sistemas I e J foram definidos a partir da ferramenta Solver (Excel, Microsoft Inc., EUA), a fim de resultar na mesma força de eluição da mistura de solventes (metanol, clorofórmio e água), descrita por Bligh e Dyer (1959).

A extração de lipídios foi realizada conforme procedimento descrito na Figura 1, utilizando a técnica de ruptura por sonda ultrassônica durante 5 min, descrito no item 4.3. A etapa de extração de solventes, os volumes e os solventes utilizados estão descritos na Tabela 1.

Sistema	Mistura de solventes	Volume de solvente (mL)	Referência
А	Etanol-Hexano-Água	2: 9,3: 0,3	Grima et al.(1994)
В	Etanol-Hexano-Água	2: 8,3: 1,3	Grima et al.(1994)
С	Etanol-Diclorometano-Água	1: 1: 2	Ryckebosch; Muylaert;
			Foubert (2012)
D	Etanol-Clorofórmio-Água	4: 4: 3,6	Este trabalho
Е	Metanol-Diclorometano-Água	4: 4: 3,6	Este trabalho
F	Metanol-Hexano-Água	4: 4: 3,6	Este trabalho
G	Hexano-Etanol-Água	4: 4: 3,6	Este trabalho
Н	Hexano-Etanol-Água	4: 4: 3,6	Este trabalho
Ι	Etanol-Acetona-Água	3,2: 5,2: 3,1	Este trabalho
J	Isopropanol-Hexano-Água	2,3: 3,5: 1,7	Este trabalho

 Tabela 1 - Sistemas de solventes utilizados na extração de lipídios.

4.7. EXTRATIBILIDADE

A extratibilidade foi calculada usando a Equação 4, baseada em Michelon et al. (2012), adaptada para o conteúdo lipídico.

Extratibilidade (%) =
$$\frac{\text{CLs}}{\text{CLc}} \times 100$$
 (4)

Onde:

CL_s: conteúdo lipídico (%), obtido no sistema de solvente;

CL_c: contéudo lipídico (%) obtido no controle, através da técnica de ruptura celular por ultrassom, utilizando o sistema de solvente metanol-clorofórmio-água.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 95% de confiança ($p\leq0,05$) ou Teste t a 95% de confiança ($p\leq0,05$). Para tal, foi utilizado o software Statistica 5.0 (Stat Soft Inc., EUA).

6. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

6.3. PRÉ-TRATAMENTO COM MICRO-ONDAS E ULTRASSOM

A Tabela 2 apresenta o conteúdo lipídico obtido para os diferentes tempos de tratamento da biomassa de *C. calcitrans* por micro-ondas e ultrassom visando à ruptura celular, comparando com a ruptura química (HCl 2 M).

Tabela 2 - Conteúdo lipídico da microalga C. calcitrans para diferentes métodos de rupturacelular.

Métodos de ruptura celular	Tempo	Lipídios (%)*
Ruptura com HCl (controle)	60 min	24,2 ± 1,0 ^A
	40 s	24,2 \pm 0,9 ^{a, A}
Micro-ondas	105 s	$22,3 \pm 1,6^{a,A}$
	300 s	$16,3 \pm 1,0^{b,B}$
	5 min	$24,6 \pm 1,3^{a,A}$
Ultrassom	10 min	$20,7 \pm 1,7^{b,B}$
	20 min	$20,4 \pm 0,3^{b,B}$

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre os tempos, para o mesmo método de ruptura celular.

*Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre os métodos de ruptura celular em comparação ao método de ruptura com HCl.

Conforme a Tabela 2, o teor de lipídios extraídos após a biomassa ser submetida às ondas ultrassônicas diminuiu significativamente ($p \le 0.05$) com o aumento do tempo de exposição de 5 min para 10 min, não havendo diferenças significativas ($p \ge 0.05$) entre 10 min e 20 min. Desta forma, verificou-se que a melhor condição correspondeu a 5 min de tratamento da biomassa com ultrassom, atingido 24,6 ± 1,3% de lipídios totais, não diferindo significativamente ($p \ge 0.05$) da ruptura com HCl 2 M (24,2 ± 1.0%). Por outro lado, os maiores tempos de exposição resultaram em percentuais de lipídios significativamente diferentes ($p \le 0.05$) em relação à ruptura química, com redução dos valores para $20.7 \pm 1.7\%$ (10 min) e $20.4 \pm 0.3\%$ (20 min), o que pode estar associado à degradação dos lipídios em condições mais drásticas de tratamento da biomassa.

Quanto ao uso de micro-ondas, o pré-tratamento durante 300 s resultou em conteúdo lipídico (16,3 \pm 1,0%), que diferiu significativamente (p≤0,05) em relação a 105 s (22,3 \pm 1,6%) e 40 s (24,2 \pm 0,9%), estes não diferindo (p≥0,05) entre si e em relação à ruptura química (24,2 \pm 1%), podendo também estar relacionado à degradação dos lipídios em condições mais drásticas.

Portanto, em ambos os métodos são preferíveis os menores tempos de exposição, 40 s para micro-ondas e 5 min para ultrassom, pelo menor custo energético em relação aos demais tempos testados.

Comparando estes dois procedimentos é possível concluir, que ambos os tratamentos proporcionaram melhores rupturas nos menores tempos de exposição, sendo que estes não diferiram entre si (micro-ondas por 40 s com $24,2 \pm 0,9\%$ de lipídios e ultrassom por 5 min com $24,6 \pm 1,3\%$ de lipídios), e também não diferiram do controle ($24,2 \pm 1,0\%$).

Através da Figura 2, que mostra a biomassa da microalga *C. calcitrans* antes e após os processos de ruptura celular, pode se observar que ambos os tratamentos foram eficientes na ruptura celular.





A eficiência na extração de lipídios em microalgas difere de acordo com a espécie e o método de extração utilizada (LEE et al., 2010). Os tratamentos de ruptura celular por ultrassom e micro-ondas tem se mostrado eficientes na ruptura celular, são métodos simples, de fácil execução e eficientes para extração de lipídios (LEE et al., 2010; VISWANATHAN et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; MA et al.; 2014).

Ma et al. (2014) compararam a ruptura celular da microalga *Chlorella* sp., por micro-ondas e ultrassom, indicando que o tratamento por micro-ondas foi mais rápido e

eficiente na ruptura celular para a extração de lipídios do que o ultrassom. Os autores atribuíram os resultados à alta pressão gerada, aliada ao rápido aquecimento e a umidade no interior da célula no processo por micro-ondas, enquanto que no processo por ultrassom a célula é rompida pelo choque das bolhas formadas pela cavitação.

Araújo et al. (2013) avaliaram a extração de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando cinco métodos de extração (Bligh e Dyer, Chen, Folch, Hara e Hadim, e Soxhlet), sendo os primeiros quatro assistidos por ultrassom. Os autores concluíram que o método de Bligh e Dyer assistido por ultrassom resultou na maior extração de lipídios. Além disso, os outros métodos assistidos por ultrassom resultaram em maior recuperação de lipídios do que o método convencional Soxhlet.

Viswanathan et al. (2012) estudaram os efeitos de três métodos de ruptura celular (autoclave, ultrassom e homogeneizador de alta pressão), utilizando inóculo contendo as microalgas *Chlorella minutíssima, Chlamydomonas globosa* e *Scenedesmus bijuga,* sendo que obtiveram acréscimo no conteúdo lipídico de 13,3%, quando aplicado o ultrassom comparado com a amostra sem tratamento de ruptura.

Lee at al. (2010) avaliaram cinco métodos de ruptura celular (autoclave, moinhos de bolas, micro-ondas, ultrassom e choque osmótico com 10% de NaCl) para as microalgas *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. Verificaram que os maiores conteúdos lipídicos para as três microalgas foram conseguidos utilizando micro-ondas. Em contrapartida, para a microalga *Botryococcus* sp., o ultrassom resultou em baixos valores para o conteúdo lipídico (8,8%), notando-se que diferentes microalgas têm comportamentos distintos frente a técnicas de ruptura diferentes, pelas diferenças na constituição da parede celular.

6.4. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A Tabela 3 mostra o perfil de ácidos graxos da microalga *C. calcitrans* após o tratamento por micro-ondas e ultrassom, comparando com aquele obtido com ruptura química (HCl 2 M). Ao observar as proporções dos ácidos graxos, verifica-se que ambos os tratamentos resultaram em um aumento dos ácidos graxos saturados (AGS) e poli-insaturados (AGPI). Com relação aos AGS, o ácido palmítico teve acréscimo de 3,3 vezes com a ruptura por micro-ondas e de 3 vezes com ultrassom, quando comparado à ruptura química. Para os AGPI, o ácido linoleico (C18:2n9t) aumentou aproximadamente 2,3 vezes e para o ácido

 γ -linolênico (C18:3n6) este aumento foi em torno de 2,8 vezes,enquanto que para o ácido α -linolênico (C18:3n3) o maior percentual foi obtido pela ruptura química.

Ma et al. (2014) estudaram a lise celular da microalga *Chlorella* sp. e obtiveram desempenho semelhante ao deste trabalho, como aumento dos ácidos palmítico e γ -linolênico em 1,7% e 6,6%, respectivamente, quando tratados com micro-ondas e ultrassom.

	Métodos de ruptura celular		
Ácido graxo	Química (controle)	Micro-ondas	Ultrassom
C12:0 (Láurico)	3,2	1,5	1,9
C16:0 (Palmítico)	4,5	15,1	13,6
(%) AGS	7,7	16,6	15,5
C14:1 (Tetradecenoico)	25,4	18,3	19,9
C15:1	0,7	0,6	0,7
C16:1 (Palmitoleico)	53,4	39,6	39,4
C18:1n9c (Oleico)	-	1,2	2,3
C18:1n9t (Elaídico)	-	-	0,4
C20:1n9 (Eicosenoico)	-	0,9	-
(%) AGMI	79,5	60,6	62,7
C18:2n9t (Linoleico)	3,7	8,4	8,2
C18:3n6 (γ-linolênico)	3,8	10,6	10,1
C18:3n3 (α–linolênico)	5,3	3,8	3,5
(%) AGPI	12,8	22,8	21,8

 Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos (%) de C. calcitrans para diferentes métodos de ruptura celular.

Li, Prodesino e Weiss (2004) mencionam em seu trabalho com extração de óleo de soja por ultrassom que a diminuição nos teores de ácidos graxos insaturados e aumento nos de teores de ácidos graxos saturados é utilizada para avaliar a extensão da oxidação, isso porque os ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis à oxidação enquanto os ácidos graxos saturados são mais estáveis. Tal afirmação pode explicar o aumento nos teores de ácido palmítico e diminuição nos teores do ácido α -linolênico, neste trabalho, ao aplicar ultrassom e micro-ondas. Porém não elucida o aumento dos teores dos ácidos linoleico e γ -linolênico, em ambos tratamentos quando comparado com a ruptura química. Uma explicação poderia estar nas reações termolábeis aliado ao tempo de exposição, uma vez que

na ruptura química com ácido clorídrico a amostra fica exposta durante 1 h a temperatura de 80°C.

Ma et al. (2014), com a microalga *Chlorella* sp., também verificaram a diminuição do percentual dos ácidos palmitoleico e α -linolênico em 10% e 3,6%, respectivamente, ao utilizar a ruptura celular por micro-ondas e ultrassom. Tal comportamento, segundo Pingret et al. (2012), é atribuído à oxidação lipídica devido aos radicais livres hidroxil (OH•) gerados durante a exposição ao ultrassom e ao micro-ondas, pela irradiação, as moléculas de água são decompostas devido a alta pressão e alta temperatura. Os radicais livres de hidroxil (OH•) clivam as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados devido à sua forte atividade e capacidade de oxidação.

Para os AGMI, o ácido tetradecenoico (C14:1) reduziu 28% quando submetido ao micro-ondas e 21,6% ao ultrassom, assim como o ácido palmitoleico (C16:1), que reduziu 25,8% e 26,2%, respectivamente, enquanto que o ácido oleico (C18:1n9c) apresentou maior proporção na ruptura por ultrassom (2,3%).

6.5. CONSUMO DE ENERGIA ELÉTRICA

A Tabela 4 mostra a estimativa da energia consumida quando da utilização de micro-ondas (40 s) e ultrassom (5 min) visando à ruptura celular, verificando-se que a técnica por ondas ultrassônicas mostrou menor consumo de energia que por micro-ondas, sendo, portanto, a condição selecionada.

Método	Volume de suspensão	Concentração da suspensão celular	Potência do equipamento	Tempo	Energia consumida pela suspensão celular	
Micro-ondas	20 mL	0,15 kg m ⁻³	$1,4x10^3$ W	40 s	2,8 GJ m ⁻³	
Ultrassom	20 mL	0,15 kg m ⁻³	130 W	5 min	1,9 GJ m ⁻³	

Tabela 4 - Consumo de energia dos métodos experimentais de ruptura celular damicroalga C.calcitrans.

Halim et al. (2012) estudaram a ruptura celular da microalga *Chlorococcum* sp. utilizando ultrassom e a energia consumida para o rompimento foi de 0,975 GJ m³(200 mL de suspensão celular, potência de 130 W, tempo de 25 min).

Lee et al. (2010) estudaram vários métodos de ruptura celular em três espécies de microalgas. A técnica utilizando micro-ondas resultou em maior extração de lipídios com 30% para *Botryococcus* sp., 10% para *Chlorella vulgaris* e 10% para *Scenedesmus* sp. A

energia consumida pelo micro-ondas foi de 2,1 GJ m⁻³ (100 mL de suspensão celular, 5 kg m⁻³ de concentração celular, potência de 700 W e tempo 5 min).

6.6. EXTRAÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES

A Tabela 5 mostra o conteúdo de lipídios extraído e a extratibilidade para diferentes sistemas de solventes.

Sistema de solvente	Mistura de solventes	Volume de solvente (mL)	Conteúdo Lipídico (%)	Extratibilidade (%)
Controle	Metanol- Clorofórmio-Água	4: 4: 3,6	24,6 \pm 1,3 $^{\rm A}$	100
А	Etanol-Hexano- Água	2: 9,3: 0,3	$1,9\pm0,8$ ^E	7,7
В	Etanol-Hexano- Água	2: 8,3: 1,3	$2,1\pm0,4~^{\rm E}$	8,5
С	Etanol- Diclorometano-Água	1:1:2	$13,5 \pm 1,6$ ^C	54,9
D	Etanol-Clorofórmio- Água	4: 4: 3,6	$22,3\pm0,4~^{\mathrm{A,B}}$	90,7
Е	Metanol- Diclorometano-Água	4: 4: 3,6	22,1 \pm 0,5 $^{\rm B}$	89,8
F	Metanol-Hexano- Água	4: 4: 3,6	$6,3 \pm 0,5$ ^D	25,6
G	Hexano-Etanol- Água	4: 4: 3,6	$6{,}0\pm0{,}6^{\rm D}$	24,4
Н	Hexano-Etanol- Água-24h	4: 4: 3,6	3,0 \pm 0,4 $^{\rm E}$	12,2
Ι	Etanol-Acetona- Água	3,2: 5,2: 3,1	$3,9\pm0,5^{\rm D,E}$	15,9
J	Isopropanol- Hexano-Água	2,3: 3,5: 5,8	$3,4 \pm 0,6^{E}$	13,8

Tabela 5 - Conteúdo lipídico (%)* e extratibilidade (%) em diferentes solventes.

* Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa entre os sistemas de solventes.

A Tabela 6 mostra os limites de tolerância para exposição aos solventes orgânicos, da OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), que integra o Departamento do Trabalho dos Estados Unidos, e da norma regulamentadora brasileira NR 15, do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE).

Os maiores valores para conteúdo de lipídios (22,3% e 22,1%) foram obtidos para os sistemas D e E, respectivamente, que não mostraram diferenças significativas entre si, sendo que o sistema D não diferiu do ensaio controle. Estes valores corresponderam a 90,7% e 89,8% de extratibilidade, respectivamente (Tabela 5). Isto possivelmente se deve à proximidade de polaridade dos solventes utilizados, uma vez que entre o etanol e o metanol e entre o clorofórmio e o diclorometano as polaridades são próximas, fazendo com que a interação dos solventes na célula da microalga tenha ação semelhante, não interferindo na extração do lipídio. No entanto, no que se diz respeito aos limites de tolerância à exposição (Tabela 6) para o clorofórmio e para o diclorometano, há controvérsias entre os órgãos brasileiro e americano. Segundo a OSHA, o limite de tolerância para a exposição ao diclorometano é de 25 ppm, e para o clorofórmio é de 50 ppm, ambos para uma jornada de trabalho de 8 h diárias, enquanto que pela Norma Regulamentadora Brasileira NR 15, o limite de tolerância para a exposição ao clorofórmio é de 20 ppm e para o diclorometano é de 156 ppm, ambos para uma jornada de 48 h semanais.

Substância (nnm)	OSHA	NR - 15	Grau de insalubridade NR – 15
Diclorometano	25 ^a	156 ^b	Máximo
Clorofórmio	50 ^a	20^{b}	Máximo
Hexano	500 ^a	Não disponíveis	-
Metanol	200 ^a	156 ^b	Máximo
Etanol	1000 ^a	780^{b}	Mínimo
Isopropanol	400 ^a	310 ^b	Médio
Acetona	1000 ^a	780^{b}	Mínimo

Tabela 6 - Limites de tolerância para exposição de solventes.

a - Limite de exposição para uma jornada de 8 h diárias.

b- Limite de exposição para uma jornada de 48 h semanais

A utilização da combinação de solventes do sistema C resultou em 54,9% de extratibilidade. Embora o conteúdo lipídico tenha reduzido para 13,5%, este sistema etanoldiclorometano-água pode contribuir expressivamente para a diminuição da toxicidade em relação aos solventes utilizados no método de Bligh e Dyer (metanol e clorofórmio), podendo ser mais apropriado em larga escala, além dos menores volumes utilizados. Conforme a NR 15, os limites de tolerância do etanol frente ao metanol é muito menor, sendo de 780 ppm e 156 ppm, respectivamente. A utilização do hexano nos sistemas F e G resultou em 6,3% e 6,0% de lipídios, com 25,6% e 24,4%, respectivamente, de extratibilidade. Viêgas (2010) aplicou os métodos de extração lipídica sob agitação magnética durante 24 h e Soxhlet, na biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, e verificou que a extração sob agitação magnética (24 h), a quantidade de lipídios extraídos não ultrapassou 3,7%, enquanto que para a extração Soxhlet foi de 1,55%. Estas baixas porcentagens foram atribuídas ao baixo conteúdo de lipídios apolares na biomassa da *Chlorella pyrenoidosa*.

Os sistemas A e B também usaram hexano e etanol, resultando em valores muito baixos para o conteúdo de lipídios (1,9% e 2,1%, respectivamente), correspondendo a 7,7% e 8,5%, respectivamente. O etanol e o hexano são solventes comumente utilizados na indústria alimentar, evitando o problema de toxicidade devido ao clorofórmio e metanol do sistema A (HARA; HADIM, 1978). Apesar do alto rendimento atingível, misturas de solventes utilizadas por Bligh e Dyer (1959) são desaconselhadas quando o produto final deve ser utilizado na indústria alimentícia (GRIMA et al.,1994).

Os sistemas I (etanol-acetona-água) e J (isopropanol-hexano-água), apresentaram baixos valores para conteúdo de lipídios (3,9% e 3,4%, respectivamente). Ryckebosh, Muylaert e Foubert (2012) utilizaram varias combinações de solventes na extração de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris*, dentre eles os solventes formados por: clorofórmio-metanol (1:1), clorofórmio-metanol (2:1), diclorometano-etanol (1:1), hexano-isopropanol (3:2), somente acetona e somente éter dietílico, com aproximadamente 24%, 18%, 13%, 10%, 12% e < 5%, respectivamente, de conteúdo lipídico. Os autores explicam que misturas de solventes polares e apolares extraem maiores porcentagens de lipídios, isso porque o solvente polar disponibiliza os lipídios dos seus complexos proteína-lipídio, facilitando a solubilização dos lipídios apolares no solvente apolar. Somente os lipídios apolares foram dissolvidos no éter dietílico (apolar), explicando a baixa porcentagem extraída ao usar este solvente.

Sheng, Vannela e Rittmann (2011) utilizaram diferentes sistemas de solventes na extração de lipídios da cianobactéria *Synechocystis*. Com etanol (96%) conseguiram cerca de 3,2% de lipídios. Hexano-isopropanol (2:3), hexano-isopropanol (3:2), hexano-etanol (1:2,5), hexano-etanol (1:0,9), somente isopropanol e somente hexano resultaram em valores muito baixos (inferiores a 2,5%).

7. CONCLUSÃO

As técnicas de ultrassom (5 min) e micro-ondas (40 s) aplicadas para a ruptura celular da microalga *C. calcitrans* mostraram-se eficientes, atingindo 24,6% e 24,2% de lipídios, respectivamente, não diferindo da ruptura química, porém a técnica por ultrassom mostrou menor consumo de energia. Com relação ao perfil de ácidos graxos, ambas as técnicas de ruptura proporcionaram o aumento na porcentagem de AGS e AGPI. Dentre os solventes utilizados para a extração lipídica os sistemas D (etanol-clorofórmio-água) e E (metanol-diclorometano-água) apresentaram maior extratibilidade, com 90,7% e 89,8%, respectivamente, e o sistema C (etanol-diclorometano-água), com 54,9% de extratibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N, FARIAS, W. L. R. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 95 - 98, 2013.

BALASUBRAMANIAN, R. K.; DOAN, T. T. Y.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215 - 216, p. 929 - 936, 2013.

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

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M., CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898 - 902, 2008.

FAJARDO, A. R.; CERDÁN, L. E; MEDINA, A. R; FERNÁNDEZ, F. G. A; MORENO, P. G; GRIMA, E. M. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 120 - 126, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497 - 509, 1957.

GRIMA, E. M.; MEDINA, A. R.; GIMÉNEZ, A. G.; PÉREZ, J. A.S.;CAMACHO, G.; SANCHEZ, J. L. G. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 955 - 959, 1994.

HALIM, R.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K, WEBLEY, P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, p. 116 – 121, 2012.

HALLIDAY, D.; HESNICH, R.; WALKER, J. Fundamentos de física. 8 ed. Rio de Janeiro, LTC, 2009. 395 p.

HARA, A; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Analytical Biochemistry, v. 90, p. 420 - 426, 1978.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Quadro geral de unidades de medida.** Portaria nº 590, de 02 de dezembro de 2013. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC002050.pdf. Acessoem 20 de jul.2017, 14:35:14.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89 - 101, 2012.

LEE, J.; YOO,C.; JUN, S.; AHN, C.; OH, H. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75 - S77, 2010.

LEE, S.; GO, S.; JEONG, G.; KIM, S. Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 561 - 566, 2011.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, n. 7, p. 731 - 738, 2004.

LI, S.; XU, J.; CHEN, J.; CHEN, J.; ZHOU, C.; YAN, X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. **Aquaculture**, v. 428, p. 104 - 110, 2014.

MA, Y.; CHENG, Y. M.; HUANG, J.; JEN, J.; HUANG, Y.; YU, C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1543 - 1549, 2014.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and modified Bligh & Dyer extraction methods. Journal of Food Composition and Analysis, v. 14, p. 93 - 100, 2001.

MCMILLAN, J. C.; WATSON, I. A.; ALI, M.; JAAFAR, W. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. **Applied Energy**, v. 103, p. 128 - 134, 2013.

METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514 - 515, 1966.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V, MEDEIROS, BURKERT, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1 - 8, 2012.
MTE, Ministério do Trabalho e Emprego. Norma regulamentadora 15. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/search?Subject%3Alist=Minist%C3%A9rio%20do%20Trabalho%2 0e%20Emprego. Acesso em: 22 de jun. 2017, 14:29:38.

NOGUEIRA, D. A. **Cultivo mixotrófico de diatomáceas utilizando glicerina como fonte de carbono.** 2013.102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

OSHA, Occupational Safety and Health Administration. Disponível em: https://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=standards&p_id=9992. Acesso: 23 de jun. 2017, 12:45:20.

PAN, J.; MUPPANENI, T.; SUN, Y.; REDDY, H. K.; FU, J.; LU, X.; DENG, S. Microwaveassisted extraction of lipids from microalgae using an ionic liquid solvent [BMIM][HSO4]. **Fuel**, v. 178, p. 49 - 55, 2016.

PINGRET, D.; DURAND, G.; TIXIER, A. F.; ROCKENBAUER, A.; GINIES, C.; CHEMAT, F. Degradation of edible oil during food processing by ultrasound:electron paramagnetic resonance, physicochemical, and sensoryappreciation. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 60, p. 7761 - 7768, 2012.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 89, p. 189 - 198, 2012.

SHENG, J.; VANNELA, R.; RITTMANN, B. E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1697 - 1703, 2011.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, n. 2, p. 87 - 96, 2006.

VIÊGAS, C. V. Extração e caracterização dos lipídios da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VISWANATHAN, T.; MANI, S.; DAS, K. C.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; SINGH, R. K.; SINGH, M. Effect of cell rupturing on the drying characteristics and lipids compositions of microalgae. **BioresourceTechonology**, v. 126, p. - 136, 2012.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostreaedulis*. Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, v. 25, p. 1 - 53, 1966.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

A microalga *C. calcitrans* foi capaz de utilizar o glicerol residual e acumular quantidades significativas de lipídios, em diferentes condições de cultivo, proporcionando efeitos positivos tanto no acúmulo de lipídios quanto na produção de biomassa em ambos os ciclos de fotoperíodo (12C:12E h e 24C:0E h), sendo a produção de lipídios favorecida à temperatura de 30°C.

O aumento da concentração de silicato de sódio não influenciou no acúmulo de lipídios, entretanto impactou positivamente a biomassa, para o fotoperíodo 12C:12E h.

Para o nitrato de sódio, em menores concentrações, houve aumento do conteúdo lipídico para ambos os ciclos de fotoperíodo.

Não houve variação no conteúdo de lipídios ao longo dos tempos e entre as condições de cultivo analisadas, porém nessas condições ocorreram mudanças no perfil de ácidos graxos, ocasionando variações expressivas nos percentuais de AGM, AGS e AGPI, bem como nos ácidos graxos individuais, observando-se a ocorrência principalmente dos ácidos palmítico (C16:0), tetradecenoico (C14:1), ácido palmitoleico (C16:1) e ácido γ - linolênico (C18:3n6).

A condição 1, mostrou características interessantes para a produção biodiesel, para o tempo de cultivo de 8 dias, a biomassa apresentou proporções interessantes de AGM e AGPI, o que resultaria, de acordo com a predição das propriedades físico-químicas, em um biodiesel que atenderia as exigências das normas brasileira, europeia e americana. A mudança das condições de cultivo, incluindo o tempo de cultivo, pode resultar em biomassa com características diferenciadas, que pode, por exemplo, ser aplicada como fonte do ácido graxo essencial γ -linolênico e fonte de ácido palmitoleico, importantes na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos.

As técnicas de ultrassom (5 min) e micro-ondas (40 s) aplicadas para a ruptura celular da microalga *C. calcitrans* mostraram-se eficientes, na extração lipídica, não diferindo da ruptura química, no entanto a técnica por ultrassom mostrou menor consumo de energia. Com relação ao perfil de ácidos graxos, ambas as técnicas de ruptura proporcionaram o aumento na porcentagem de AGS e AGPI.

Dentre os solventes utilizados para a extração lipídica os sistemas D (etanolclorofórmio-água) e E (metanol-diclorometano-água) apresentaram maior extratibilidade, com 90,7% e 89,8%, respectivamente, e o sistema C (etanol-diclorometano-água), com 54,9% de extratibilidade.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a capacidade fotossintética da microalga C. calcitrans;
- Estudar o cultivo heterotrófico 0C: 24E h (Claro:Escuro);
- Estudar o ciclo de fotoperíodo de 18C:6E h (Claro:Escuro);
- Realizar o estudo em batelada alimentada utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono;
- Testas novos métodos de ruptura celular;
- Testar novos sistemas de solventes.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETR[OLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: http://www.anp.gov.br. Acesso em: 22 de jul. 2016, 10:54:07.

ARAÚJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N, FARIAS, W. L. R. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 95 - 98, 2013.

ARAÚJO, J. L. **Fotossíntese.** Slide Share, 2016. Disponível em: https://www.slideshare.net/JosLeandroAraujo/fisiologia-vegetal-e-ecofisiologia-fotossintese. Acesso em: 20 de fev. 2017, 14:40:20.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 463 - 472, 2009.

BABUSKIN, S.; RADHAKRISHNAN, K.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1653 – 1660, 2014.

BALASUBRAMANIAN, R. K.; DOAN, T. T. Y.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215 - 216, p. 929 - 936, 2013.

BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p. 45 - 62, 2015.

BÉLIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 35 - 42, 2016.

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

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 229 - 248, 2000.

CASTRO, M. D. Q.; CAPOTE, F. P. Techniques and instrumentation in analytical chemistry.1 ed. Córdoba: ELSEVIER, 2007. 398 p.

CERIANI, R.; GONÇALVES, C. B.; RABELO, J.; CARUSO, M.; CUNHA, A. C. C.; CAVALERI, F. H.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. Group contribution model for predicting viscosity of fatty compounds. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 965 - 972, 2007. CERÓN-GARCÍA, M. C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; CONTRERAS-GÓMEZ, A.; MOLINA-GRIMA, E. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semicontinuous modes. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 569 - 576, 2013.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada.** 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006. 544p.

CHANDRA, R.; ROHIT, M. V.; SWAMY,Y. V.; MOHAN, S. V. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 279 - 287, 2014.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v 110, p. 510 - 516, 2012.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1649 - 1655, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, v. 25, p. 294 - 306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology,** v. 167, p. 201 - 214, 2013.

CHISTI, Y. **Raceways-based production of algal crude oil**. In: Posten, C., Walter, C. (Eds.). Microalgal biotechnology: Potential and production. DE GRUYTER, Berlin, p. 113 - 146, 2012.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603 - 607, 2002.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M., CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898 - 902, 2008.

CREFEBIO – **Centro de Referência da Cadeia de Produção de Biocombustíveis para a Agricultura Familiar.** Oferta de glicerina e produção de biodiesel. Disponível em: http://biomercado.com.br/not_detalhe.php?noticia=1248 09/03/2015. Acesso em: 10 de jun. 2017, 17:10:40.

DOAN, T. T. Y.; SIVALOGANATHAN, B.; OBBARD, J. P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2534 - 2544, 2011.

DUARTE, S. H.; MAUGERI, F. Prediction of quality properties for biodiesel production by oleaginous yeast cultivated in pure and raw glycerol. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 463 - 468, 2014.

FAJARDO, A. R.; CERDÁN, L. E; MEDINA, A. R; FERNÁNDEZ, F. G. A; MORENO, P. G; GRIMA, E. M. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 120 - 126, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497 - 509, 1957.

FOO, S. C.; YUSOFF, F.; ISMAIL, M.; BASRI, M.; CHAN, K. W.; KHONG, N. M. H.; YAU, S. K. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. **Algal Research**, v. 12, p. 26 - 32, 2015.

FRANCISCO, E. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p - 395 - 403, 2010.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484 - 491, 2013.

GRIMA, E. M.; MEDINA, A. R.; GIMÉNEZ, A. G.; PÉREZ, J. A.S.; CAMACHO, G.; SANCHEZ, J. L. G. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 955 - 959, 1994.

GUDE, V. G.; PATIL, P.; MARTINEZ-GUERRA, E.; DENG, S.; NIRMALAKHANDAN, N. Microwave energy potential for biodiesel production. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 5, p. 1 - 31, 2013.

HALIM, R.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K, WEBLEY, P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, p. 116 – 121, 2012.

HALLIDAY, D.; HESNICH, R.; WALKER, J. Fundamentos de física. 8 ed. Rio de Janeiro, LTC, 2009. 395 p.

HARA, A; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Analytical Biochemistry, v. 90, p. 420 - 426, 1978.

HEMALATHA, A.; KARTHIKEYAN, P.; MANIMARAN, K. Effect of temperature on the growth of marine diatom, *Chaetoceros simplex* (Ostenfeld, 1901) with different nitrate: silicate concentrations. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1817 - S1821, 2012.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245 - 2253, 2011.

HOFFMANN, L. J.; PEEKEN, I.; LOCHTE, K. Iron, silicate, and light co-limitation of three Southern Ocean diatom species. **Polar Biology**, v. 31, p. 1067 - 1080, 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38 - 46, 2010.

HUANG, X.; HUANG, Z.; WEN, W.; YAN, J. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium of the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). Journal Applied Phycology, v.25, p. 129 - 137, 2013.

INDHUMATHI, P.; SHABUDEEN, P. S.; SHOBA, U. S.A method for production and characterization of biodiesel from green microalgae. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v.6, n. 5, p. 111 - 122, 2014.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Quadro Geral de Unidades de medida.** Portaria nº 590, de 02 de dezembro de 2013. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC002050.pdf. Acessoem 20 de jul.2017, 14:35:14.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, p. 4607 - 4638, 2013.

JUNYING, Z.; JUNFENG, R.; BAONING, Z. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, p. 80 - 100, 2013.

KAMZOLOVA, S. V.; VINOKUROVA, N. G.; LUNINA, J. N.; ZELENKOVA, N. F.; MORGUNOV, I. G. Production of technical-grade sodium citrate from glycerol containing biodiesel waste by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 250 - 255, 2015.

KAPPE, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. Angewandte Chemie International Edition, v. 43, p. 6250 - 6284, 2004.

KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S.; PANT, A. CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial Cell Factories**, v. 11:71, p. 1 - 13, 2012.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research e development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642 - 656, 2013.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059 - 1070, 2005.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89 - 101, 2012.

LEE, J.; YOO,C.; JUN, S.; AHN, C.; OH, H. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75 - S77, 2010.

LEE, S.; GO, S.; JEONG, G.; KIM, S. Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 561 - 566, 2011.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, n. 7, p. 731 - 738, 2004.

LI, S.; XU, J.; CHEN, J.; CHEN, J.; ZHOU, C.; YAN, X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. **Aquaculture**, v. 428, p. 104 - 110, 2014.

LIANG, M.; JIANG, J. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 395 - 408, 2013.

LIN, T., WU, J. Effect of sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 100 - 107, 2015.

LIU, X.; DUAN,S.; LI, A.; XU, N.; CAI, Z.; HU, Z. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis and respiration of *Phaeodatylum tricornutum*. Journal of Applied **Phycology**, v. 21, p. 239 - 246, 2009.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596 -1608, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas princípios e aplicaçõe**s. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

LV, X.; ZOU, L.; SUN, B.; WANG, J.; SUN, M. Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 391, p. 73 - 83, 2010.

MA, Y.; CHENG, Y. M.; HUANG, J.; JEN, J.; HUANG, Y.; YU, C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1543 - 1549, 2014.

MACHADO JR, F. R. S.; MICHELON, M.; DALCANTON, F.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F.; BURKERT, C. A. V. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: Bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1253 - 1260, 2015.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and modified Bligh & Dyer extraction methods. Journal of Food Composition and Analysis, v. 14, p. 93 - 100, 2001.

MCMILLAN, J.C.; WATSON, I. A.; ALI, M.; JAAFAR, W. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. **Applied Energy**, v. 103, p. 128 - 134, 2013.

METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514 - 515, 1966.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V, MEDEIROS, BURKERT, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1 - 8, 2012.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da produção de biodiesel. **Revista** Virtual de Química, v. 3, n. 5, p. 416 – 425, 2011.

MTE, Ministério do Trabalho e Emprego. Norma regulamentadora 15. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/search?Subject%3Alist=Minist%C3%A9rio%20do%20Trabalho%2 0e%20Emprego. Acesso em: 22 de jun. 2017, 14:29:38.

NOGUEIRA, D. A. **Cultivo mixotrófico de diatomáceas utilizando glicerina como fonte de carbono.** 2013.102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

OSHA, Occupational Safety and Health Administration. Disponível em: https://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=standards&p_id=9992. Acesso: 23 de jun. 2017, 12:45:20.

PALUDO; M. **Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: Impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico.** 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

PAN, J.; MUPPANENI, T.; SUN, Y.; REDDY, H. K.; FU, J.; LU, X.; DENG, S. Microwaveassisted extraction of lipids from microalgae using an ionic liquid solvent [BMIM][HSO4]. **Fuel**, v. 178, p. 49 - 55, 2016.

PARMAR, A.; SINGH, N.K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163 - 10172, 2011.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. P.; MRSKO, M. F.Biodiesel renovável derivado de microalgas: Avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013 – 2018, 2012.

PINGRET, D.; DURAND, G.; TIXIER, A. F.; ROCKENBAUER, A.; GINIES, C.; CHEMAT, F. Degradation of edible oil during food processing by ultrasound:electron paramagnetic resonance, physicochemical, and sensory appreciation. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 60, p. 7761 - 7768, 2012.

PÍSKOVÁ, A. **Frustules fósseis da diatomácea do mar de Aral e do lago Baikal.** Dreamstime.com, 2010. Disponível em: https://pt.dreamstime.com/fotografia-de-stockdiatomceas-cyclotella-e-aulacoseira-spp-image14918642. Acesso em: 08 de jun. 2017, 11:09:40. PRATIWI, A. R.; SYAH, D.; HARDJITO, L.; PANGGABEAN, L. M. G.; SUHARTONO, M. T. Fatty acid synthesis by indonesian marine diatom, *Chaetoceros gracilis*. Journal of **Biosciences**, v. 16, n. 4, p. 151 - 156, 2009.

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

RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M. M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: New perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1 - 11, 2014.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630 - 635, 2014.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, p. 102 - 111, 2012.

RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2. Ed, Wiley-Blackwell, 2013. 736 p.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 89, p. 189 - 198, 2012.

RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W.; ŻAROWSKA, B.; SKRZYPIŃSKI, A. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. **World Journal Microbial Biotechnology**, v. 26, p. 1217 - 1224, 2010.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. Química Nova, v. 25, n. 4, p. 660 - 667, 2002.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; GALLAS, J. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, n. 4, p. 413 - 420, 2013.

SERASPE, E. B.; GABOTERO, S.; DE LA PEÑA, M. R.; PAHILA, I. G.; AMAR, E. C. Evaluation of dietary freeze-dried *Chaetoceros calcitrans* supplementation to control *Vibrio harveyi* infection on *Penaeus monodon* juvenile. **Aquaculture**, v. 432, p. 212 - 216, 2014.

SHENG, J.; VANNELA, R.; RITTMANN, B. E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1697 1703, 2011.

SINGH, P.; GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAWAT, I.; BUX, F. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus*

falcatus KJ 671624 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 22 - 29, 2015.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: Lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415 - 422, 2015.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, n. 2, p. 87 - 96, 2006.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y.V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789 - 793, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3 ed. Porto Alegre, ARTMED, 2004. 1.338 p.

TANGO, M. D. **Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas.** 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

TANTANASARIT, C.; ENGLANDE, A. J.; BABEL, S. Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 446, p. 67 - 75, 2013.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide - producing bacteria. Journal of Applied Biotechnology, v. 3, p. 61 - 73, 2015.

VERHOEF, S.; GAO, N.; RUIJSSENAARS, R. J.; WINDE, J. H. Crude glycerol as feedstock for the sustainable production of p-hydroxybenzoate by *Pseudomonas putida* S12. New **Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 114 - 119, 2014.

VIÊGAS, C. V. Extração e caracterização dos lipídios da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VISWANATHAN, T.; MANI, S.; DAS, K. C.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; SINGH, R. K.; SINGH, M. Effect of cell rupturing on the drying characteristics and lipids compositions of microalgae. **Bioresource Techonology**, v. 126, p. 131 - 136, 2012.

VLYSIDIS, A.; BINNS, M.; WEBBA, C.; THEODOROPOULOS, C. Glycerol utilization for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58 - 59, p. 1 - 11, 2011.

WADUMESTHRIGE, K.; SMITH, J. C.; WILSON, R.; SALLEY, S. O.; SIMON, K. Y. Investigation of the parameters affecting the cetane number of biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 85, p. 1073 - 1081, 2008.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7 - 11, 2013.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, v.25, p. 1 - 53, 1966.

YANG, M.; ZHAO, W.; XIE, X. Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. Acta Ecologia Sinica, v. 34, p. 311 - 319, 2014.

YEESANG, C.; CHEIRSILP, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3034 - 3040, 2011.

ZHANG, L.; BANGPING, L.; ZHONGQIU, W.; LEI, G.; ZHOU, Y. Changes in growth and photosynthesis of mixotrophic *Ochromonas* sp. in response to different concentrations of glucose. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 2671 - 2678, 2016.

ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. M.; COIMBRA, J. S. R.; MARTINS, E. C. A.; SILVA, D. X.; ROMERO, J. T. Revisão: Propriedades físico-químicas do biodiesel. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 21, p. 55 - 72, 2011.





APÊNDICE A – Curva padrão da microlaga Chaetoceros calcitrans

APÊNDICE B - Curvas de crescimento celular da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes condições de cultivo. (□) controle (0 g L⁻¹), (◊) 3,37 g L⁻¹ e (o) 5,61 g L⁻¹ de glicerol residual



Figura 1A – Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), temperatura de 20°C **Figura 1B** – Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), temperatura de 20°C



Figura 1C – Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), temperatura de 25°C **Figura 1D** – Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro, temperatura de 25°C



Figura 1E – Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), temperatura de 30°C **Figura 1F** – Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), temperatura de 30°C

Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro)								
Temperatura								
Glicerol residual (g L ⁻¹)	20°C 25°C 30°C							
	$X_{max}(g L^{-1})$ $P(g L^{-1} dia^{-1})$ $X_{max}(g L^{-1})$ $P(g I)$		$P (g L^{-1} dia^{-1})$	X _{max} (g L ⁻¹)	$P(g L^{-1} dia^{-1})$			
0 (controle)	$0,55\pm0,05$ ^{b, A, α}	$0,06 \pm 0,01^{\text{ b, A, }\alpha}$	$0,46\pm0,09$ ^{b, A, α}	$0,05 \pm 0,01^{\text{ b, A, }\alpha}$	$0,22 \pm 0,01^{c, B, \beta}$	$0,02 < 0,01^{c, B, \beta}$		
3,37	$1,00\pm0,10^{a,b,A,\alpha}$	$0,16\pm0,02$ a, A, α	$0,80\pm0,19$ a, b, A,B, α	$0,09\pm0,02^{\text{ a, B, }\alpha}$	$0,63\pm0,06^{b,B,\beta}$	$0,06\pm0,01^{\text{b},\text{B},\beta}$		
5,61	$1,19\pm0,33^{a,A,\alpha}$	$0,12\pm0,03^{a,A,\alpha}$	$0,97\pm0,11$ ^{a, A, α}	$0,10\pm0,01^{\text{a, A, }\alpha}$	$0,87\pm0,14^{\text{ a, A, }\beta}$	$0,09\pm0,01^{a,A,\beta}$		
Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro)								
		J	ſemperatura					
Glicerol residual (g L ⁻¹)	200	°C	25°	С	30°C			
	X _{max} (g L ⁻¹)	$P(g L^{-1} dia^{-1})$	$X_{max}(g L^{-1})$	$P (g L^{-1} dia^{-1})$	X _{max} (g L ⁻¹)	P (g L ⁻¹ dia ⁻¹)		
0 (controle)	$0,43 \pm 0,07$ ^{b, A, a}	0,04± 0,01 ^{b, A, α}	$0,50 \pm 0,04^{a, A, \alpha}$	$0,05 < 0,01^{a, A, \alpha}$	$0,54 \pm 0,14^{\text{ b, A, }\alpha}$	$0,07 \pm 0,02^{\text{ b, A, }\alpha}$		
3,37	1,04 \pm 0,10 ^{a, B, α}	0,11 ± 0,01 ^{a, B, β}	$0,58\pm0,06^{a,C,\alpha}$	$0,06\pm0,01^{a, C, \alpha}$	$1,59\pm0,25$ ^{a, A, α}	$0,19\pm0,03^{a,A,\alpha}$		
5,61	$1,00 \pm 0,13^{a, B, \alpha}$	$0,11 \pm 0,01^{a, B, \alpha}$	$0{,}53\pm0{,}07^{\text{ a, C, }\beta}$	$0,05\pm0,01^{a,C,\beta}$	$1,48 \pm 0,25^{a, A, \alpha}$	$0,21\pm0,03$ ^{a, A, α}		

APÊNDICE C - Média ± desvio padrão para biomassa máxima e produtividade da microalga *Chaetoceros calcitrans* e análise estatística dos dados, em diferentes concentrações de glicerol residual, temperatura e ciclo de fotoperíodo

X_{max}- Biomassa máxima; P - Produtividade

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p<0,05) entre as concentrações de glicerol residual para temperatura e luminosidade fixas. *Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa (p<0,05) entre as temperaturas para luminosidades e concentração de glicerol residual fixas. *Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa (p<0,05) entre os ciclos de fotoperíodo para temperatura e concentração de glicerol residual

fixas.

101000								
Ciclo de fotoperíodo								
12C:12E h (Claro:Escuro) 24C:0E h (Claro:Escuro)								
		Temperatura						
Glicerol Residual (g L ⁻¹)	20°C	25°C	30° C	20°C 25°C		30° C		
0 (Controle)	$17,7 \pm 2,8^{c, A, \beta}$	$19,3 \pm 0,9^{b, A, \alpha}$	$6,0 \pm 1,2^{b, B, \beta}$	$25,9 \pm 1,3^{c, A, \alpha}$	$15,4 \pm 0,8^{b, B, \beta}$	$13,5 \pm 2,4^{c, B, \alpha}$		
3,37	$27,6\pm0,7^{\text{ b, B, }\alpha}$	$22,0 \pm 2,92^{b, C, \alpha}$	$36,6\pm2,6^{a,A,\beta}$	$32,9\pm4,3^{\text{ b, B, }\alpha}$	26, $8 \pm 6,0^{a, B, \alpha}$	$45,1\pm1,9^{a,A,\alpha}$		
5,61	$32,9 \pm 1,5^{a, B, \beta}$	$32,1\pm 2,5^{a, B, \alpha}$	$38,1\pm2,3^{a,A,\alpha}$	$40,2\pm0,7^{a,A,\alpha}$	$24,9\pm2,8$ a, C, β	$33,2\pm1,1^{b,B,\beta}$		

APÊNDICE D – Conteúdo lipídico da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes concentrações de glicerol residual, temperatura e ciclo de fotoperíodo

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as concentrações de glicerol residual para temperatura e ciclo de fotoperíodo fixos. *Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as temperaturas para ciclo de fotoperíodo e concentração de glicerol residual fixos. *Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre os ciclos de fotoperíodo para temperatura e concentração de glicerol residual fixas.

APÊNDICE E – Lipídios totais da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes concentrações de glicerol residual, temperatura e ciclo de fotoperíodo

Ciclo de fotoperíodo								
12C:12E h (Claro:Escuro)24C:0E h (Claro:Escuro)								
Temperatura				Temperatura				
Glicerol residual (g L ⁻¹) 20°C		25°C	30° C	20°C	25°C	30°C		
0 (Controle)	$0,10 < 0,01^{\text{b, A, a}}$	$0,09\pm0,01^{\text{ b, A, }\alpha}$	$0,01 < 0,01$ ^{c, B, β}	$0,09\pm0,02^{\text{ b, A, }\alpha}$	$0,07\pm0,01^{b,A,\alpha}$	$0,06 \pm 0,01^{b, A, \alpha}$		
3,37	$0,33\pm0,10^{a,b,A,\alpha}$	$0,11\pm0,05$ ^{b, B, α}	0,24 ±0,02 ^{b, A, B, β}	$0,28\pm0,08^{\text{ a, B, }\alpha}$	$0,13\pm0,04$ ^{a, C, α}	$0,49\pm0,02^{\text{ a, A, }\alpha}$		
5,61	$0,40 \pm 0,13^{a, A, \alpha}$	$0,23 \pm 0,03^{a, A, \alpha}$	$0,30\pm0,04$ ^{a, A, α}	$0,37\pm0,05^{a,A,\alpha}$	$0,13 < 0,01^{a, b, B, \beta}$	$0,42\pm0,08^{\text{ a, A, }\alpha}$		

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as concentrações de glicerol residual para temperatura e ciclo de fotoperíodo fixos. *Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as temperaturas para ciclo de fotoperíodo e concentração de glicerol residual fixos. *Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre os ciclos de fotoperíodo para temperatura e concentração de glicerol residual fixas. APÊNDICE F – Média ± desvio padrão para biomassa máxima (X_{max}), biomassa final (X_{final}), produtividade de biomassa máxima (P_{max}), produtividade de biomassa final (P_{final}), conteúdo de lipídios (CL) e lipídios totais (LT) da microalga *Chaetoceros calcitrans* e análise estatística dos dados, em diferentes concentrações de silicato de sódio, para a condição 1 e 2

		Condição 1		Condição 2				
	Concentra	Concentração de silicato de sódio (g L ⁻¹)			Concentração de silicato de sódio (g L ⁻¹)			
	0,02	0,08	0,14	0,02 0,08 0,14				
X _{max} (g L ⁻¹)	$1,40 \pm 0,13^{\text{ a, A}}$	$1,59 \pm 0,25$ ^{a, A}	$1,71 \pm 0,06^{\text{ a, A}}$	$1,28\pm0,07^{a,\ A}$	$0,87 \pm 0,14^{b,B}$	$1,36 \pm 0,03^{a, B}$		
X final (g L ⁻¹)	$1,26 \pm 0,17$ ^{a, A}	$1,55 \pm 0,23$ ^{a, A}	$1,17 \pm 0,07$ ^{a, B}	$0,91\pm0,08^{b,\mathrm{B}}$	$0{,}78\pm0{,}07^{\;b{,}B}$	$1,\!36\pm0,\!03^{a,A}$		
P _{max} (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	$0{,}28\pm0{,}03^{\text{ a, A}}$	$0,\!19\pm0,\!03^{\;b,A}$	$0,24 \pm 0,01^{\ a,\ b,\ A}$	$0,18 \pm 0,01$ ^{a, B}	$0,09 \pm 0,01$ ^{c, B}	$0,13 < 0,01^{b, B}$		
P_{final} (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	$0,12\pm 0,07$ ^{a, A}	$0,15\pm 0,02^{\text{ a, A}}$	$0,11 \pm 0,01$ ^{a, B}	$0,09\pm0,01^{b,\mathrm{A}}$	$0,07 \pm 0,01$ ^{b, B}	0,13 < 0,01 ^{a, A}		
CL (%)	$34,5 \pm 4,2^{b, A}$	$45,1 \pm 1,9^{a, A}$	$31,2\pm0,8^{\text{ b, B}}$	$34,3 \pm 1,1^{a, A}$	$38,1\pm2,3^{a,B}$	$35,6 \pm 0,7$ ^{a, A}		
LT (g L ⁻¹)	$0,44 \pm 0,11^{b, A}$	$0,70 \pm 0,12^{\text{ a, A}}$	$0,\!37\pm0,\!02^{\;b,\;B}$	$0,31 \pm 0,04^{b, A}$	$0,30 \pm 0,04$ ^{b, B}	$0,48 \pm 0,02$ ^{a, A}		

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as concentrações de silicato de sódio, para condição fixa. *Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0,05$) entre as condições 1 e 2 para concentração de silicato de sódio fixa. **Condição 1** - Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração 3,37 g L⁻¹ de GR, temperatura de 30°C.

Condição 2- Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração 5,61 g L⁻¹ de GR, temperatura de 30°C.

APÊNDICE G - Curvas de biomassa versus tempo da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes concentrações de silicato de sódio (0) 0,02 g L⁻¹ (◊) 0,08 g L⁻¹ e (□) 0,14 g L⁻¹)



Figura A – Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), 5,61 g L⁻¹ de glicerol residual, temperatura de 30°C. **Figura B** – Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), 3,37 g L⁻¹ de glicerol residual, temperatura de 30°C.

APÊNDICE H – Média ± desvio padrão para biomassa máxima (X_{max}), biomassa final (X_{final}), produtividade máxima (P_{max}), produtividade final (P_{final}), conteúdo de lipídios (CL) e lipídios totais (LT) da microalga *Chaetoceros calcitrans* e análise estatística dos dados, em diferentes nitrato de sódio, para a condição 1 e 2

		Con	ndição 1	* *	Condição 2				
	Concentração de nitrato de sódio (g L ⁻¹)				Concentração de nitrato de sódio (g L ⁻¹)				
	0,0001	0,0002	0,0005	0,001	0,0001	0,0002	0,0005	0,001	
$X_{max}(g L^{-1})$	$0,57 \pm 0,02^{\text{ b, B}}$	$1,59 \pm 0,25$ a, A	$0,87 \pm 0,07$ ^{b, B}	$0,57 \pm 0,03$ ^{b, A}	$0,73 \pm 0,04$ ^{b, A}	$1,22 \pm 0,18^{a, A}$	$1,18 \pm 0,05^{\text{ a, A}}$	$0,8 \pm 0,08$ ^{b, B}	
$X_{final} (g L^{-1})$	$0,56 \pm 0,03^{\text{ b, B}}$	$1,55 \pm 0,23^{a, A}$	$0,63 \pm 0,06^{\text{ b, B}}$	$0{,}48\pm0{,}09^{\;b{,}B}$	$0,67 \pm 0,01^{\text{ b, A}}$	$0,78\pm0,07^{\text{ a, b, B}}$	$0{,}93\pm0{,}10^{\text{ a, A}}$	$0,62\pm0,08^{\text{ b, A}}$	
P_{max} (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	$0,11 \pm 0,00$ ^{c, A}	$0,19 \pm 0,03^{a, A}$	0,17 ±0,01 ^{a, b, A}	$0,13 \pm 0,01$ b, c, A	0,08 < 0,01 ^{c, B}	$0,09 \pm 0,01$ ^{c, B}	0,16 < 0,01 a, A	0,13±0,01 ^{b, A}	
P_{final} (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,05 <0,01 ^{b, B}	$0,15\pm0,02$ ^{a, A}	$0,06 \pm 0,01^{b, B}$	$0,04\pm 0,01^{b, A}$	0,06 < 0,01 ^{b, A}	$0,07 \pm 0,01$ ^{a,b, B}	$0,\!09\pm0,\!01~^{\rm a,~A}$	$0,06\pm0,01$ ^{b, A}	
CL (%)	$35,6 \pm 0,4^{\text{b, B}}$	$45,1 \pm 1,9^{a, A}$	$10,28 \pm 0,70^{\text{ c, B}}$	$8,2 \pm 1,1^{c,B}$	$40,61 \pm 2,40^{\text{ a, A}}$	$38,12 \pm 2,31^{a, b, B}$	$30,52 \pm 3,60^{\text{ b, A}}$	$15,78 \pm 4,02$ ^{c, A}	
LT (g L ⁻¹)	$0,\!20\pm0,\!01^{b,B}$	$0{,}49\pm0{,}02^{\text{ a, A}}$	0,06 < 0,01 ^{c, B}	0,04 < 0,01 ^{c, B}	$0,27 \pm 0,01$ ^{a, A}	$0,30 \pm 0,04^{\text{ a, B}}$	$0,28\pm0,05$ ^{a, A}	$0,10 \pm 0,04^{\text{ b, A}}$	

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre as concentrações de nitrato de sódio, para condição fixa. *Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p \ge 0.05$) entre as condições 1 e 2 para concentração de nitrato de sódio fixa. **Condição 1** - Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), concentração 3.37 g L⁻¹ de GR, 0.08 g L⁻¹ de silicato de sódio, temperatura de 30°C. **Condição 2-** Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), concentração 5.61 g L⁻¹ de GR, 0.14 g L⁻¹ de silicato de sódio temperatura de 30°C.

APÊNDICE I - Curvas de crescimento celular da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes concentrações de nitrato de sódio ($_{0}$) 0,0001 g L⁻¹, ($_{\Delta}$) 0,002 g L⁻¹ ($_{\Box}$) 0,0005 g L⁻¹) ($_{0}$) 0,001 g L⁻¹



Figura A – Ciclo de fotoperíodo 12C:12E h (Claro:Escuro), 5,61 g L^{-1} de glicerol residual, 0,14 g L^{-1} de silicato de sódio, temperatura de 30°C.

Figura B – Ciclo de fotoperíodo 24C:0E h (Claro:Escuro), 3,37 g L⁻¹ de glicerol residual, 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, temperatura de 30°C.

APÊNDICE J – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 3 dias)



APÊNDICE K – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 3 dias)



APÊNDICE L – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃ temperatura de 30°C e tempo de 3 dias)



APÊNDICE M – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 6 dias)



APÊNDICE N – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 6 dias)



APÊNDICE O – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga Chaetoceros calcitrans para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 6 dias)



APÊNDICE P – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga Chaetoceros calcitrans para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 8 dias)



APÊNDICE Q – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 8 dias)



APÊNDICE R – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 8 dias)



APÊNDICE S – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃ temperatura de 30°C e tempo de 10 dias)


APÊNDICE T – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 10 dias)



APÊNDICE W – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 1 (ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, concentração de 3,37 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,08 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0002 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 10 dias)



APÊNDICE U – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 3 dias)



APÊNDICE V – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 3 dias)



APÊNDICE X – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 3 dias)



APÊNDICE Y – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 6 dias)



APÊNDICE Z – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 6 dias)



APÊNDICE AA – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga Chaetoceros calcitrans para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 6 dias)



APÊNDICE BB – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 8 dias)



APÊNDICE CC – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga Chaetoceros calcitrans para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 8 dias)



APÊNDICE DD – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga Chaetoceros calcitrans para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 8 dias)



APÊNDICE EE– Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 10 dias)



APÊNDICE FF – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga Chaetoceros calcitrans para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 10 dias)



APÊNDICE GG – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a condição de cultivo 2 (ciclo de fotoperíodo 12C:12E h, concentração de 5,61 g L⁻¹ de GR, concentração de 0,14 g L⁻¹ de silicato de sódio, concentração de 0,0001 g L¹ de NaNO₃, temperatura de 30°C e tempo de 10 dias)



APÊNDICE HH – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a ruptura celular utilizando HCl (controle)



APÊNDICE II – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a ruptura celular utilizando micro-ondas no tempo de 40 s





APÊNDICE JJ – Cromatograma do perfil de ácidos graxos da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a ruptura celular utilizando ultrassom no tempo de 5 min