

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

**PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS PELA MICROALGA *Chlorella* E OBTENÇÃO DE
NANOEMULSÃO DE ORIGEM MICROALGAL**

ENG. ALIM. SHANA PIRES FERREIRA

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

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

RIO GRANDE, RS

2013

Ao meu marido Alysson dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À CAPES/Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos e ao CNPq – Rede Nanofotobiotec III, pelo apoio financeiro, que foi indispensável para tornar este trabalho executável e pela bolsa de doutorado (CAPES).

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela qualidade do curso de Doutorado e pela disponibilização de sua infraestrutura.

Ao professor **Jorge Alberto Vieira Costa**, pela orientação e conhecimentos adquiridos ao longo dessa jornada.

À professora **Leonor de Souza-Soares** pelo aprendizado adquirido na disciplina de Ciência e Tecnologia de Óleos e Gorduras, ministrada por ela, que resultou no primeiro artigo dessa tese.

À **Aninha**, que mesmo antes de se tornar professora da FURG sempre se mostrou pronta a me ajudar e com quem compartilhei e discuti diversos problemas encontrados no cultivo das microalgas.

À mais nova professora da FURG **Elisângela Radmann**, pelas várias dicas na parte experimental do trabalho.

Aos ICs **Jefferson e Eduarda** que contribuíram na execução de uma parte do trabalho experimental.

À professora **Jaqueline Buffon**, pela boa vontade e disposição em ajudar na fase inicial do trabalho, mais especificamente no perfil de ácidos graxos e interpretação dos resultados quando os mesmos foram rodados no programa estatística.

À professora **Michele Moraes**, pela contribuição na correção dos dois primeiros artigos dessa tese.

À professora **Lucielen dos Santos**, pela grande ajuda para rodar os resultados, da parte final do trabalho, no programa estatística.

Ao **Roque Zílio**, técnico do LEB, pela grande ajuda e disposição sempre que necessitei.

À **Cris Lisboa**, pela oportunidade de trabalharmos juntas desde o início do doutorado, com quem compartilhei algumas fases do trabalho experimental tanto meu quanto dela e viagem ao Rio de Janeiro na tentativa de aprender um pouquinho sobre nanotecnologia.

A **Etiele Moraes**, pela grande ajuda na revisão da tradução dos *abstracts* que aparecem ao longo dessa tese.

À **Sabrina**, amizade que conquistei ao longo do período do doutorado e com quem compartilhei muitos momentos de descontração e risadas além de ter me ajudado em alguns momentos do trabalho experimental.

Às queridas **Thaisa**, **Lisi** e **Ana Cláudia** com quem compartilhei vários momentos de lazer, risadas e também pela grande contribuição ao longo do trabalho.

À **Marília** e ao **Alexandre**, pela boa vontade em ajudar na parte de antibióticos para os cultivos, além do empréstimo do carboy de 5 L e à **Denise**, pela ajuda na preparação e realização das análises de microbiologia, principalmente na contagem de micro-organismos em placas.

À **Luiza** e ao **Gabriel** pelas dicas na análise de lipídeos e pelas conversas quando estávamos na bancada de trabalho.

À **Célia**, pessoa muito acessível que sempre se mostrou disponível em ajudar e, com quem compartilhei várias dúvidas e dificuldades na tentativa de obter emulsão de microalga.

A professora **Nadya Pesce da Silveira**, do Instituto de Química (laboratório LAMEL) da UFRGS pela disponibilização dos equipamentos e pessoal para realização das análises de DLS e potencial zeta.

Aos demais colegas do LEB que tive a oportunidade de compartilhar ideias e aprendizado e que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

Ao meu grande amigo, companheiro, amor e marido **Alysson** que sempre está ao meu lado indiferente de qual seja o momento, que se preocupa comigo e faz tudo o que pode por mim, e com quem sempre compartilho minhas decisões. O meu muito obrigada de coração! Serei eternamente grata por tudo! TE AMO MUITO!

À minha sogra **Ana Lúcia**, que considero minha segunda mãe, quem esta sempre preocupada e rezando por mim e por ser uma pessoa que torce muito pelo meu sucesso e que vibra com minhas conquistas.

Aos meus avós **Noeli Pires, Ramão Pires e Maria Ferreira**, pelas orações, preocupação e palavras de carinho. E ao meu avô **Edison Ferreira** (*in memorium*) que mesmo não estando mais entre nós permanece comigo nas lembranças e, tenho certeza que de onde estiver estará sempre me protegendo. O meu muito obrigada. Amo vocês!

À minha irmã **Claudia Ferreira dos Santos** que tanto amo e admiro pela sua vontade de crescer sempre e ao meu cunhado **César de Oliveira dos Santos** pelo exemplo de dedicação pessoal e profissional.

Ao meu irmão **Leandro Pires Ferreira** e à minha cunhada **Raquel Santos**, que mesmo distantes tenho certeza que torcem pelo meu sucesso. Além disso, agradeço por me darem o prazer de ser tia novamente.

Aos meus sobrinhos que tanto admiro **Bruno Ferreira Pias, Guilherme Ferreira dos Santos, Isabelle Moraes Gonçalves e Marina Moraes Gonçalves** sempre alegrando a minha vida e me enchendo de encanto. Amo muito vocês!

E, por fim, à base de tudo na minha vida. Meus pais, **Myriam Gladys Pires Ferreira e Luiz Carlos de Almeida Ferreira**, pessoas dignas, honestas e acima de tudo exemplos de vida. AMO MUITO VOCÊS!!!

RESUMO

O cultivo de microalgas tem sido realizado visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Além disso, os lipídeos produzidos pelas microalgas podem ser utilizados na preparação de nanoemulsões que consistem em uma dispersão muito fina composta por uma fase oleosa e uma fase aquosa, com tamanho de gota, em escala nanométrica. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial da microalga *Chlorella* quanto a produção de lipídeos e obter nanoemulsão utilizando lipídeo de origem microalgal. As microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima* foram cultivadas de modo heterotrófico. Foi observado que cultivos realizados com Meio BG11 adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose apresentaram concentração celular máxima (1,62; 1,53; 1,14 g.L⁻¹) para *Chlorella* sp., *C. homosphaera*, e *C. minutissima*, respectivamente enquanto que os ensaios sem glicose mantiveram-se com concentração celular igual à do início dos experimentos (0,15 g.L⁻¹). A microalga *C. homosphaera* cultivada em Meio BG11 e 10 g.L⁻¹ de glicose apresentou a maior concentração de lipídeos na biomassa seca (22,4 %p/p). A máxima concentração de PUFA (35,25 %p/p) e de ácidos graxos essenciais (35,05 %p/p) foi encontrada no cultivo de *C. homosphaera* em Meio Basal sem glicose, sendo esse o meio mais adequado para produção de PUFA e ácidos graxos essenciais. Posteriormente, para a microalga *C. homosphaera* foi feito um planejamento experimental do tipo 2² com três repetições no ponto central, tendo-se como fatores as concentrações de glicose (5, 10 e 15 g.L⁻¹) e de NaNO₃ (0,5; 1,0 e 1,5 g.L⁻¹), e as concentrações de lipídeos totais e de biomassa como respostas. Verificou-se que o cultivo realizado com 5 g.L⁻¹ de glicose e 1,5 g.L⁻¹ de NaNO₃ foi o que apresentou produção de biomassa de 1,22 g.L⁻¹ e produtividade lipídica de 13,07 mg.L⁻¹.d⁻¹, com predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0 - 23,6 %p/p) e linoléico (C18:1n9 - 22,4 %p/p). A seguir, a microalga *C. minutissima* foi objeto de estudo, realizando-se outro planejamento experimental do tipo 2² com três pontos centrais, tendo-se como fatores as concentrações de glicose (1, 5 e 9 g.L⁻¹) e de NaNO₃ (0,2; 0,75 e 1,3 g.L⁻¹), e as concentrações de lipídeos totais e de biomassa como respostas. Verificou-se que o cultivo realizado com 9 g.L⁻¹ de glicose e 0,2 g.L⁻¹ de NaNO₃ apresentou maior concentração de lipídeos (29,38 %p/p), crescimento celular de 0,89 g.L⁻¹ e um perfil lipídico com 26,6 %p/p de ácidos graxos saturados, 62,4 %p/p de monoinsaturados e 11 %p/p de poli-insaturados. Na última etapa do trabalho, foi produzida nanoemulsão utilizando lipídeo de microalga. O menor tamanho de gota (187,9 nm) e baixo índice de polidispersão (0,114) foram obtidos na nanoemulsão preparada sem a adição de Tween®80. Todas emulsões apresentaram estabilidade, com valores de potencial zeta maiores que 30 mV, em módulo. Sendo assim, os lipídeos de microalgas são uma fonte promissora na preparação de nanoemulsões com potencial benefício para saúde humana.

PALAVRAS CHAVE: *Chlorella*, lipídeos, microalga, nanotecnologia, nanoemulsão.

ABSTRACT

LIPIDS PRODUCTION BY *Chlorella* MICROALGA AND OBTAINING OF MICROALGAL NANOEMULSION

The microalgae cultivation have been conducted aimed at biomass production for use in food preparation and natural compounds obtainment with high world market value. In this context, lipids produced by microalgae can be used in nanoemulsions preparation which consist of thin dispersion composed by an oil and an aqueous phase with nanoscale droplet size. The objectives of this study were obtained lipids from microalgae, with higher polyunsaturated fatty acids (PUFAs) concentrations and get nanoemulsion using microalgal lipid source. *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. and *Chlorella minutissima* microalgae were grown, heterotrophic mode, varying cultivation conditions. It was observed that cultures performed in BG11 Media supplemented with 10 g.L⁻¹ glucose showed maximum biomass concentration (1.62, 1.53, 1.14 g.L⁻¹) for *chlorella* sp., *C. homosphaera* and *C. minutissima*, respectively, while no glucose tests were maintained with equal biomass concentration since the beginning of the experiments (0.15 g.L⁻¹). The *C. homosphaera* cultivated in BG11 Media and 10 g.L⁻¹ glucose showed a higher concentration of lipids in dry biomass (22.4 %w/w). The maximum PUFA (35.25 %w/w) and essential fatty acids concentration (35.05 %w/w) was found in *C. homosphaera* cultivation in Basal Media without glucose, which is the most appropriate media for PUFAs and essential fatty acids production. Thereafter, for the *C. homosphaera* microalga was made a 2² full factorial experimental design with three replicates at the center point, using factors glucose (5, 10 and 15 g.L⁻¹) and NaNO₃ (0.5, 1.0 and 1.5 g.L⁻¹) concentrations, and total lipid and biomass concentrations as solutions. The cultivation performed with 5 g.L⁻¹ of glucose and 1.5 g.L⁻¹ of NaNO₃ showed the biomass yield of 1.22 g.L⁻¹ and lipid productivity of 13.07 mg.L⁻¹.d⁻¹, predominantly palmitic fatty acid (C16:0 - 23.6 %w/w) and linoleic acid (C18:1n9 - 22.4 %w/w). Hereafter, *C. minutissima* microalga been studied, performing other 2² full factorial experimental design made with three replicates at the center point, using factors glucose (1, 5 and 9 g.L⁻¹) and NaNO₃ (0.2, 0.75 and 1.3 g.L⁻¹) concentrations, and total lipid and biomass concentrations as a solutions. The cultivation performed with 9 g.L⁻¹ of glucose and 0.2 g.L⁻¹ of NaNO₃ showed higher lipid concentration (29.38 %w/w), cell growth of 0.89 g.L⁻¹ and a lipid profile of 26.6 %w/w saturated, 62.4 %w/w of monounsaturated and 11.0 %w/w of polyunsaturated fatty acids. In the last stage of the work, was produced nanoemulsion using microalga lipid. The smallest droplet size (187.9 nm) and low polydispersity index (0.114) were obtained without addition of Tween®80. All emulsions were stable, with values of zeta potential greater than 30 mV, in magnitude. Thus, the lipid of *Chlorella* microalgae are a promising source for the preparation of nanoemulsions with potential benefits for human health.

KEY WORDS: *Chlorella*, lipids, microalga, nanotechnology, nanoemulsion.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - Revisão: Microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos graxos essenciais

Tabela 1 - Conteúdo lipídico e suas respectivas produtividades para diferentes espécies de microalgas.....	48
Tabela 2 - Concentração de ácidos graxos essenciais de diversas microalgas cultivadas na presença de luz.....	63
Tabela 3 - Concentração de lipídeos e ácidos graxos poli-insaturados obtidos no cultivo heterotrófico de <i>Chlorella protothecoides</i>	64

ARTIGO 2 - Perfil de ácidos graxos de biomassa de *Chlorella* obtida por cultivo heterotrófico em fed batch

Tabela 1 - Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g.L ⁻¹), produtividade diária máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g.L ⁻¹ .d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, l.d ⁻¹), concentrações de lipídeos (%p/p), PUFA (%p/p) e $\omega 6+\omega 3$ (%p/p) para os ensaios realizados com as três espécies de <i>Chlorella</i>	80
Tabela 2 - Perfil cromatográfico (%p/p) das microalgas cultivadas sob diferentes condições.	85

ARTIGO 3 - Conteúdo lipídico da biomassa de *Chlorella homosphaera* cultivada de modo heterotrófico sob diferentes concentrações de carbono e nitrogênio

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2 ² com as variáveis reais e codificadas, concentração máxima de biomassa, concentração de lipídeos totais e produtividade lipídica	102
Tabela 2 - Fatores de conversão calculados para os diferentes experimentos do planejamento fatorial	105
Tabela 3 - Perfil cromatográfico (%p/p) da microalga <i>Chlorella homosphaera</i> cultivada com 5 g.L ⁻¹ de glicose e 1,5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃	107

Tabela 4 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de lipídeos totais	109
Tabela 5 - Análise de variância da resposta concentração de lipídeos totais (%p/p) a um nível de confiança de 90 %.....	109
Tabela 6 - Valores de concentração de lipídeos experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento fatorial completo 2 ²	111
Tabela 7 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração máxima de biomassa	112
Tabela 8 - Análise de variância da resposta concentração máxima de biomassa (g.L ⁻¹) a um nível de confiança de 90 %.....	112
Tabela 9 - Valores de biomassa máxima (X _{máx}) experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento fatorial completo 2 ²	114

ARTIGO 4 - Influência das condições de cultivo na produção heterotrófica de lipídeos pela microalga *Chlorella minutissima*

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2 ² com as variáveis codificadas e as respostas concentração máxima de biomassa (X _{máx} , g.L ⁻¹) e concentração de lipídeos totais (%p/p)	131
Tabela 2 - Fatores de conversão calculados para os diferentes experimentos do planejamento fatorial	133
Tabela 3 - Perfil cromatográfico (%p/p) da microalga <i>Chlorella minutissima</i> cultivada com 9 g.L ⁻¹ de glicose e 0,2 g.L ⁻¹ de NaNO ₃	136
Tabela 4 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de lipídeos totais	137
Tabela 5 - Análise de variância da resposta concentração de lipídeos totais (%p/p) a um nível de confiança de 95 %.....	137
Tabela 6 - Valores de concentração de lipídeos experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento fatorial completo 2 ²	139
Tabela 7 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração celular máxima	140

ARTIGO 5: Desenvolvimento de nanoemulsões com lipídeos extraídos de microalgas

Tabela 1 - Composição das emulsões..... 150

Tabela 2 - Parâmetros de estabilidade das diferentes emulsões óleo em água..... 153

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Microfotografia da microalga <i>Chlorella</i>	27
Figura 2 - Representação esquemática dos glóbulos das emulsões óleo em água (a) e água em óleo (b)	36
Figura 3 - Representação esquemática de um tensoativo	39

ARTIGO 1 - Revisão: Microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos graxos essenciais

Figura 1 - Localização subcelular do metabolismo lipídico. As células de leveduras e de vertebrados diferem das células dos vegetais superiores na compartimentalização do metabolismo lipídico	52
Figura 2 - Visão global da via de síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA via acetil-CoA carboxilase	53
Figura 3 - Adição de dois carbonos a uma cadeia acil graxo em crescimento: uma sequência de quatro etapas	54
Figura 4 - O processo global da síntese do palmitato.....	55
Figura 5 - Vias de síntese de outros ácidos graxos.....	56
Figura 6 - Biossíntese de três famílias de ácidos graxos	58

ARTIGO 2 - Perfil de ácidos graxos de biomassa de *Chlorella* obtida por cultivo heterotrófico em fed batch

Figura 1 - Curvas de crescimento das microalgas cultivadas nos Meios BG11 e Basal: (a) <i>Chlorella homosphaera</i> (b) <i>Chlorella</i> sp. (c) <i>Chlorella minutissima</i>	77
---	----

ARTIGO 3 - Conteúdo lipídico da biomassa de *Chlorella homosphaera* cultivada de modo heterotrófico sob diferentes concentrações de carbono e nitrogênio

Figura 1 - Curvas de crescimento celular em função do consumo de glicose e de nitrogênio..... 100

Figura 2 - Superfície de resposta da concentração de lipídeos totais em relação as variáveis estudadas, concentração de glicose e concentração de NaNO₃..... 110

Figura 3 - Superfície de resposta da concentração máxima de biomassa em relação as variáveis estudadas concentração de glicose e concentração de NaNO₃..... 113

ARTIGO 4 - Influência das condições de cultivo na produção heterotrófica de lipídeos pela microalga *Chlorella minutissima*

Figura 1 - Curvas de crescimento celular em função do consumo de glicose e nitrogênio 127

Figura 2 - Superfície de resposta da concentração de lipídeos totais em relação às variáveis estudadas concentração de glicose e concentração de NaNO₃..... 138

ARTIGO 5: Desenvolvimento de nanoemulsões com lipídeos extraídos de microalgas

Figura 1 - Microscopia ótica (objetiva de 40X) das diferentes emulsões preparadas com alta energia de emulsificação..... 152

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	16
1.1 INTRODUÇÃO	18
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo geral	20
1.2.2 Objetivos específicos	20
1.3 JUSTIFICATIVA	21
CAPITULO II - REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 REVISAO DA LITERATURA.....	26
2.1.1 Microalgas	26
2.1.1.1 Microalga <i>Chlorella</i>	26
2.1.2 Cultivo de microalgas.....	28
2.1.3 Fatores físico-químicos que influenciam no cultivo de microalgas	28
2.1.3.1 Carbono como nutriente no cultivo de microalgas.....	30
2.1.3.2 Nitrogênio como nutriente no cultivo de microalgas	30
2.1.4 Formas de condução do cultivo heterotrófico de microalgas.....	31
2.1.5 Lipídeos	32
2.1.6 Nanotecnologia e Nanobiotecnologia.....	33
2.1.7 Riscos e perspectivas da nanotecnologia.....	34
2.1.8 Nanoemulsões.....	35
2.1.8.1 Métodos de preparação de nanoemulsões	37
2.1.9 Estabilidade das nanoemulsões	38
2.1.10 Tensoativos.....	39
CAPITULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	42
3.1 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO - ARTIGOS	43
3.2 ARTIGO 1 - REVISÃO: MICROALGAS: UMA FONTE ALTERNATIVA NA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS	44
3.2.1 RESUMO	44
3.2.2 ABSTRACT	45
3.2.3 INTRODUÇÃO.....	45

3.2.4 MICROALGAS.....	46
3.2.5 LIPÍDEOS DE MICROALGAS.....	49
3.2.6 SÍNTESE E METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	51
3.2.7 BENEFÍCIOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ω 3 DE ORIGEM MICROALGAL.....	60
3.2.8 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	61
3.2.8.1 Na presença de luz (cultivo autotrófico)	61
3.2.8.2 Na ausência de luz (cultivo heterotrófico).....	64
3.2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
3.2.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
3.3 ARTIGO 2 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BIOMASSA DE <i>CHLORELLA</i> OBTIDA POR CULTIVO HETEROTRÓFICO EM FED BATCH.....	71
3.3.1 RESUMO	71
3.3.2 ABSTRACT	71
3.3.3 INTRODUÇÃO.....	72
3.3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.3.4.1 Micro-organismos e meios de cultivo	73
3.3.4.2 Condições de cultivo	74
3.3.4.3 Determinações analíticas	75
3.3.4.4 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos.....	75
3.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.3.6 CONCLUSÃO.....	86
3.3.7 AGRADECIMENTOS	86
3.3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
3.4 ARTIGO 3 - CONTEÚDO LIPÍDICO DA BIOMASSA DE <i>CHLORELLA</i> <i>HOMOSPHERA</i> CULTIVADA DE MODO HETEROTRÓFICO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBONO E NITROGÊNIO	91
3.4.1 RESUMO	91
3.4.2 ABSTRACT	91
3.4.3 INTRODUÇÃO.....	92
3.4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	94
3.4.4.1 Micro-organismo e meio de cultivo	94

3.4.4.2 Condições de cultivo	94
3.4.4.3 Determinações analíticas	95
3.4.4.4 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos.....	95
3.4.4.5 Delineamento experimental	96
3.4.4.6 Produtividade lipídica.....	97
3.4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
3.4.6 CONCLUSÃO.....	115
3.4.7 AGRADECIMENTOS	115
3.4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
3.5 ARTIGO 4 - INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO HETEROTRÓFICA DE LIPÍDEOS PELA MICROALGA <i>CHLORELLA MINUTISSIMA</i> ..	120
3.5.1 RESUMO	120
3.5.2 ABSTRACT	120
3.5.3 INTRODUÇÃO.....	121
3.5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	122
3.5.4.1 Micro-organismo e meio de cultivo	122
3.5.4.2 Condições de cultivo	123
3.5.4.3 Determinações analíticas	123
3.5.4.4 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos.....	124
3.5.4.5 Delineamento experimental	125
3.4.4.6 Produtividade lipídica.....	125
3.5.4.7 Fatores de conversão	126
3.5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
3.5.6 CONCLUSÃO.....	140
3.5.7 AGRADECIMENTOS	141
3.5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
3.6 ARTIGO 5 - DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES COM LIPÍDEOS EXTRAÍDOS DE MICROALGAS	145
3.6.1 RESUMO	145
3.6.2 ABSTRACT	145
3.6.3 INTRODUÇÃO.....	146
3.6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	147

3.6.4.1 Micro-organismos.....	147
3.6.4.2 Quantificação e extração de lipídeos totais	148
3.6.4.3 Preparação das nanoemulsões	149
3.6.4.4 Análise do tamanho das gotas	151
3.6.4.5 Determinação do potencial zeta.....	151
3.6.4.6 Microscopia ótica	152
3.6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	152
3.6.6 CONCLUSÃO.....	156
3.6.7 AGRADECIMENTOS	156
3.6.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
CAPITULO IV - CONCLUSÃO GERAL	160
4.1 CONCLUSÃO GERAL.....	161
CAPITULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
5.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	176

CAPÍTULO I - Introdução geral, Justificativa e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

O interesse no cultivo de microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro, principalmente, por apresentar vantagens como a simplicidade de nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico, como os ácidos graxos (COSTA et al., 2006). A partir do cultivo da microalga, podem ser obtidos produtos como a própria biomassa, proteínas, carboidratos, corantes, antioxidantes, ácidos graxos, enzimas e polímeros. Essas substâncias bioativas são extraídas a partir de cultivos em grande escala, nas chamadas “biorefinarias” (JUNIOR, 2007).

Cultivos heterotrófico e mixotrófico de microalgas são muito conhecidos por propiciarem crescimento microalgal rápido e elevado acúmulo de material lipídico (ácidos graxos) nas células de microalgas quando comparados com os cultivos autotróficos (MITRA et al., 2012). Além disso, o cultivo heterotrófico apresenta maior produtividade lipídica, frente aos cultivos autotrófico e mixotrófico (CHEN et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Como estes cultivos são realizados na ausência de luz, faz-se necessário o emprego de compostos orgânicos, como fonte de carbono e energia, para produção de biomassa e realização de outras funções celulares importantes para o metabolismo microalgal (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011). As fontes de carbono exógenas mais comumente utilizadas por estes micro-organismos são glicose (XU et al., 2006; LIANG et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2010; O’GRADY e MORGAN, 2011), acetato (HEREDIA-ARROYO et al., 2010) e glicerol (LIANG et al., 2009; O’GRADY e MORGAN, 2011).

Quando as microalgas são submetidas a uma condição de estresse são estimuladas à produzir maior concentração de determinada substância (MORAIS, 2006). No caso de cultivos heterotróficos, o estresse celular pode estar relacionado à ausência de luz e em alguns casos, associado também à restrição de algum nutriente do meio de cultura.

Desta forma, estimular a síntese de lipídeos e ácidos graxos por meio da aplicação de um estresse específico é uma técnica importante no estudo biotecnológico (MORAIS, 2006). As principais aplicações dos lipídeos e ácidos graxos de microalgas

são no enriquecimento de rações para peixes, possibilidade de uso para produção de biodiesel, fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana (MORAIS e COSTA, 2008) e fármacos (RADMANN e COSTA, 2008).

Os ácidos graxos nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os poli-insaturados (PUFAs) representam entre 35 e 60 % dos lipídeos totais (RICHMOND, 1986). Os PUFAs de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais (PULZ e GROSS, 2004; BERTOLDI et al., 2008) por apresentarem efeitos benéficos à saúde tais como prevenção e atenuação de problemas cardíacos, doenças crônicas e controle do colesterol.

A forma de administração destes agentes, no entanto, precisa ser adequada para possibilitar a eficácia terapêutica. Dentro deste contexto, a nanotecnologia tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo, devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais, entre eles os nanocarreadores de fármacos e/ou ingredientes funcionais e ao impacto que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico (DURÁN et al., 2012). Sendo assim, esta nova tecnologia consiste na habilidade de manipular a matéria na escala nanométrica para criar estruturas com uma organização molecular diferenciada. Uma das grandes vantagens dessa tecnologia é o aumento da área superficial dos materiais na escala nano, o que torna estes materiais muito mais reativos (PAULL et al., 2003), apresentando novas propriedades.

Entre os nanocarreadores podemos citar as nanoemulsões que podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (fase interna) é disperso em outro (fase externa) na forma de gotículas, na presença de agente emulsificante. Apesar da instabilidade termodinâmica, as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades (KLANG e BENITA, 1998). Além disso, apresentam tamanho de gota variando entre 50 e 1000 nm de diâmetro (GUTIÉRREZ et al., 2008).

A utilização das nanoemulsões na indústria de alimentos pode estar associada a incorporação de alimentos funcionais, tal como os lipídeos de microalgas ricos em ácidos graxos poli-insaturados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de lipídeos, ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), a partir do cultivo heterotrófico de microalgas e desenvolver nanoemulsões de origem microalgal.

1.2.2 Objetivos específicos

- Estudar o cultivo heterotrófico, para produção de lipídeos, das microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima*;
- Determinar o perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima* cultivadas de modo heterotrófico;
- Selecionar a microalga que produz maior concentração de lipídeos;
- Estudar a influência da concentração de carbono e nitrogênio na produção de lipídeos e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs);
- Maximizar a produção de lipídeos e PUFAs utilizando a técnica de planejamento experimental;
- Selecionar a condição de cultivo que favorece maior acúmulo intracelular de lipídeos;
- Desenvolver nanoemulsão utilizando como fase oleosa o lipídeo extraído da biomassa de microalga obtida em cultivo heterotrófico.

1.3 JUSTIFICATIVA

Muitas das substâncias sintetizadas e acumuladas pelas microalgas são também encontradas nas plantas, as quais evoluíram das algas verdes ou clorófitas (RAVEN et al., 2001). Entretanto, segundo Cohen (1986) e Richmond (1986), a produção microalgal pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas:

Cultivo de microalgas: as microalgas são um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica. Além disso, muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos anuais de biomassa (maior produtividade). Ainda, as microalgas podem crescer em regiões com condições climáticas extremas e os cultivos desenvolvidos com água marinha ou de estuários. Estas condições não podem ser convencionalmente empregadas no cultivo de plantas com valor para a agricultura;

Natureza unicelular: esta morfologia assegura que toda biomassa tenha a mesma composição bioquímica, o que não ocorre com as plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes;

Manipulação das condições de cultivo: por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, por exemplo) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídeos, biopolímeros, entre outros. Tais compostos apresentam elevado valor comercial, principalmente por serem produtos naturais;

Ciclo de vida: o ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies.

A biomassa microalgal e os extratos de biomassa estão ganhando destaque no mercado mundial, principalmente, em virtude do aumento da demanda por produtos que apresentam substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados e proteínas imunologicamente efetivas (COHEN, 1999).

Os lipídeos são um dos principais componentes das microalgas e, do ponto de vista nutricional, apresentam um papel importante como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais ($\omega 3$, por exemplo). Os ácidos graxos essenciais devem ser adicionados à dieta já que não podem ser sintetizados pelo metabolismo humano e contribuem para prevenção e atenuação de problemas cardíacos, controle de colesterol, ativação do sistema imunológico e crescimento celular. Especificamente, o consumo de $\omega 3$ obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir doenças como câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Por este motivo, os ácidos graxos poli-insaturados de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais (PULZ e GROSS, 2004; BERTOLDI et al., 2008).

Sabe-se que as condições de cultivo influenciam a produção de biomassa microalgal e, conseqüentemente, a obtenção dos ácidos graxos essenciais. O cultivo heterotrófico de microalgas é realizado na ausência de luz e por isso torna-se necessário a utilização de compostos orgânicos, como fonte de carbono e energia, para o crescimento celular e realização de funções celulares (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Este tipo de cultivo é muito conhecido por propiciar crescimento microalgal rápido e elevado acúmulo de material lipídico (ácidos graxos) nas células de microalgas, quando comparados com os cultivos autotróficos, os quais são realizados na presença de luz (MITRA et al., 2012). Além disso, oferece várias vantagens sobre o cultivo autotrófico, por exemplo a eliminação da variação da fonte natural de luz, mantendo-se o controle do processo de cultivo e baixo custo para recuperação da biomassa (HUANG et al., 2010; XU et al., 2006). Tendo em vista o que foi exposto acima, o cultivo heterotrófico de microalgas têm despertado interesse na área de biotecnologia (LIANG et al., 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Segundo Wu et al. (1994), algumas espécies de *Chlorella* têm a capacidade de crescer em ambiente fotoautotrófico ou heterotrófico, como por exemplo, a *Chlorella protothecoides*. Xu et al. (2006) cultivaram esta microalga nos dois modos, autotrófico e heterotrófico, e o conteúdo de lipídeos foi de 14,57 % e 55,20 %, respectivamente. Sabendo-se que a microalga do gênero *Chlorella* é excelente produtora de lipídeos quando se trata de cultivo em modo heterotrófico, decidiu-se escolher as microalgas

Chlorella homosphaera, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima* do banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para realizar o estudo.

Recentemente, a nanotecnologia rapidamente emergiu como um dos campos de pesquisa mais promissores e atraentes, podendo a indústria de alimentos se beneficiar neste cenário. Esta tecnologia oferece potencial para melhorar a biodisponibilidade e solubilidade de diferentes ingredientes funcionais, tais como ácidos graxos, carotenoides (QUINTANILLA-CARVAJAL et al., 2010) e antioxidantes naturais, que estão sendo amplamente utilizados como ingredientes ativos em uma grande variedade de produtos alimentícios (MORARU et al., 2003). Além disso, a aplicação da nanotecnologia na área de alimentos pode permitir a modificação de muitas características de produtos alimentares, em macroescala, tais como textura, sabor, outros atributos sensoriais, intensidade de coloração, processabilidade e estabilidade durante a vida de prateleira, levando a um grande número de novos produtos. Através desta nova tecnologia é possível melhorar a solubilidade em água, estabilidade térmica, e biodisponibilidade oral de compostos funcionais (HUANG et al., 2010a).

O desenvolvimento de nanoemulsões é um dos campos de aplicação mais interessantes, uma vez que elas podem atuar como carreadoras ou sistemas de entrega de compostos lipofílicos, tais como nutracêuticos, fármacos, sabores, antioxidantes, e agentes antimicrobianos (WEISS et al., 2008). O processo de emulsificação, na indústria alimentícia, tem papel importante na formação da consistência e textura de produtos, assim como na dispersão das fases (PRIETO, 2007). Sendo assim, dois exemplos clássicos de emulsões alimentícias podem ser observados nas maioneses e margarinas.

Além disso, a pesquisa na área de obtenção de nanoemulsões utilizando lipídeo de origem microalgal, como fase oleosa de uma emulsão óleo em água (O/A), desperta grande interesse, pois não encontramos trabalhos publicados nesse ramo da nanotecnologia, mostrando a originalidade do estudo. As emulsões de grau alimentício formadas a partir de óleos ricos em $\omega 3$ (ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), tais como àquele extraído da biomassa de microalga, será comercialmente atraente devido aos benefícios para a saúde humana, como a prevenção de uma série de doenças crônicas, que estão associados ao consumo destas emulsões.

Tendo em vista o que foi exposto acima, o projeto Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos, objetiva formar uma rede de pesquisa e desenvolvimento de bioprocessos e bioprodutos nanotecnológicos ligados à produção de biomassa e bioprodutos microalgais, com formação de recursos humanos em nível de pós-graduação. Neste contexto, esta tese está inserida neste projeto podendo contribuir com a pesquisa na área biotecnológica através da obtenção de lipídeos, através de cultivos heterotróficos em batelada alimentada de microalgas do gênero *Chlorella*, para utilização na preparação de nanoemulsões que podem ser empregadas na indústria de alimentos como nanocarreadores de alimentos funcionais.

CAPITULO II - Revisão da Literatura

2.1 REVISAO DA LITERATURA

2.1.1 Microalgas

A denominação microalgas inclui organismos que vivem em meio ambiente aquático e que possuem dois tipos de estrutura celular: procariótica e eucariótica (VONSHAK, 1997; DERNER et al., 2006). Os procarióticos têm representantes nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*. Já os eucarióticos possuem representantes nas Divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae* etc.), *Cryptophyta* e *Dinophyta* (DERNER et al., 2006).

A aplicação de microalgas como alimento constitui a utilização mais antiga destes organismos, sendo empregadas na alimentação humana como fonte de suplemento alimentar de alto valor nutricional, de biocorantes, e na alimentação animal. O uso das microalgas como alimento para animais aquáticos emprega grande número de espécies, pertencentes a diversas categorias taxonômicas. Sendo assim, o conhecimento da composição química das espécies, em termos de substâncias de valor nutritivo é muito importante. Além disso, estudos têm sido realizados para o emprego de biocombustíveis e como forma de fixar CO₂ originado na atividade industrial e na geração térmica de energia elétrica (ROSA e COSTA, 2008). O cultivo comercial de microalgas em larga escala começou nos anos 60 no Japão com a cultura da *Chlorella*, seguida nos anos 70-90 pelo cultivo de *Spirulina* no México, Estados Unidos e China. Em um período de cerca de 30 anos a indústria biotecnológica da microalga cresceu e se diversificou muito (RADMANN, 2007).

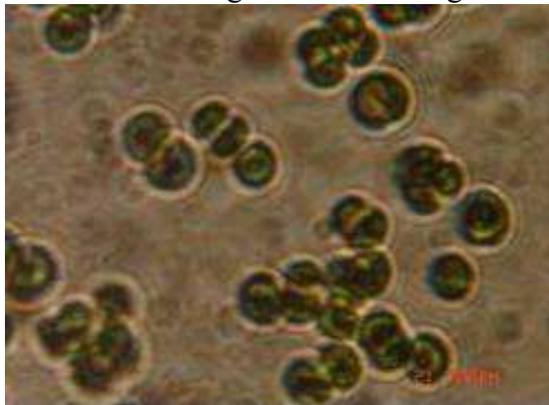
2.1.1.1 Microalga *Chlorella*

A *Chlorella* é uma microalga eucariótica unicelular esférica, microscópica e seu diâmetro varia de 5-10 µm (ILLMAN et al., 2000), trata-se de uma microalga da divisão *Chlorophyta* e ordem *Chlorococcales*. Esta microalga possui cloroplasto verde, circundado por duas membranas e sua parede celular é composta de pectina e celulose ou de polímeros de xilose ou manose conectadas com a proteína. Além disso, em muitos

gêneros, as paredes celulares estão incrustadas com carbonato de cálcio, sílica e, menos frequentemente, outros minerais como óxido de ferro (MARGULIS e SCHWARTZ, 2001).

A microalga *Chlorella* (Figura 1) foi descoberta pelos japoneses (RICHMOND, 1986), tradicionais consumidores de algas, os quais a apreciam e a utilizam normalmente como complemento alimentar. É uma microalga rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais, aminoácidos essenciais e lipídeos, principalmente quando cultivadas de modo heterotrófico. Esta microalga possui 53 % de proteínas, 23 % de carboidratos, 9 % de lipídeos e 5 % de minerais (HENRIKSON, 1994). Ela contém ainda mais de 2 % de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, em que a fonte principal de energia é a luz solar (VONSHAK, 1997). Segundo Sung et al. (1999), a *Chlorella* apresenta velocidade específica de crescimento quase constante em valores de pH acima de 4,2; e por esse motivo ela cresce facilmente em tanques e lagos.

Figura 1 - Microfotografia da microalga *Chlorella*



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica (FURG).

Uma característica importante da microalga *Chlorella* é que a mesma possui o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. Além disso, a microalga *Chlorella* apresenta alta capacidade de fixação de CO₂ (YANAGI et al., 1995; HIRATA et al., 1996; YOSHIHARA et al., 1996; SUNG et al. 1999; MORAIS e COSTA, 2007), é resistente a altas temperaturas (YOSHIHARA et al., 1996; LEE et al. 2002) e possui habilidade de crescer na presença e ausência de luz

produzindo diversos bioprodutos, dentre eles lipídeos (WU et al., 1994; XU et al., 2006; LIANG et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2010; MITRA et al., 2012).

2.1.2 Cultivo de microalgas

A finalidade do processo biotecnológico é o crescimento do micro-organismo em condições ambientais que estimulem a síntese do produto que se deseja obter (TREVAN et al., 1990; BORZANI et al., 2001). Sendo assim, o cultivo de microalgas pode ser realizado de três maneiras distintas: autotrófico (fotoautotrófico), heterotrófico e mixotrófico. Assim, o que diferencia o modo como o cultivo será conduzido é a fonte de carbono utilizada e presença ou não de luz (BOROWITZKA, 1999; CHEN et al., 2011).

No cultivo autotrófico as microalgas crescem utilizando luz e dióxido de carbono como fonte de carbono e energia. Nos cultivos em modo heterotrófico, as microalgas usam compostos orgânicos como energia e fonte de carbono. As principais fontes de carbono orgânico assimiladas pelas microalgas, neste tipo de cultivo, são glicose, acetato, glicerol, frutose, lactose, galactose e manose (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004; DERNER, 2006; CHEN et al., 2011). Os cultivos mixotróficos são uma combinação dos outros dois modos de cultivos (autotrófico e heterotrófico) nos quais utilizam simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004; DERNER, 2006).

2.1.3 Fatores físico-químicos que influenciam no cultivo de microalgas

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros micro-organismos sobre o desenvolvimento algal. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade (especialmente para microalgas marinhas), disponibilidade de nutrientes

(YONGMANITCHAI e WARD, 1991; CHEN e CHEN, 2006), pH, agitação (MIAO e WU, 2004; CHEN e CHEN, 2006), nível de oxigênio dissolvido (CHEN e CHEN, 2006) e tipo de (foto)biorreatores (SONG et al., 2008).

A temperatura pode influenciar o crescimento celular e a composição química das microalgas. Quando as células de *Chlorella* são cultivadas em temperatura entre 25 e 35 °C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos e lipídeos aumenta (OGBONNA e TANAKA, 1996).

O pH do meio também é importante no processo de cultivo, variando de neutro a alcalino para a maioria das espécies de microalgas (RAVEN, 1990). Como qualquer outro micro-organismo, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. O pH interfere em todas as reações químicas e bioquímicas, além de interferir nas conformações espaciais das moléculas. O pH é considerado um dos parâmetros mais críticos para atividade biológica. A forma predominante de carbono é altamente dependente do pH, sendo que valores de pH mais alcalinos favorecem a forma bicarbonato (HCO_3^-), que constitui mais de 80 % em pH entre 7 e 9, enquanto as formas de CO_2 livre e carbonato (CO_3^{2-}) predominam abaixo ou acima destes valores, respectivamente (ARAUJO, 2005).

A agitação da cultura torna-se muito importante para otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas. A agitação da cultura, em meio líquido, mantém as células em suspensão evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo do fotobiorreator e outras permaneçam na superfície recebendo luz em excesso (cultivo autotrófico ou mixotrófico) (BECKER e VENKATARMAN, 1984). Além disso, a agitação evita a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND, 1986).

Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode representar fator limitante para a produção. No caso de cultivos em meios de cultura alternativos (resíduos industriais ou agrícolas), os fatores limitantes para a produção de biomassa restringem-se à luz, temperatura e agitação da cultura (DUARTE, 2001).

2.1.3.1 Carbono como nutriente no cultivo de microalgas

De acordo com Derner (2006), o carbono é considerado o macronutriente mais importante nos cultivos de microalgas, constituindo cerca de 50 % da biomassa, e por isso pode atuar como fator limitante no crescimento microalgal. Além disso, a elevada demanda deste macronutriente, essencial no cultivo de microalgas, é explicada pelo fato do mesmo estar presente em todas as substâncias que a célula microalgal sintetiza (LOURENÇO, 2006).

As microalgas são capazes de assimilar tanto carbono inorgânico quanto orgânico como forma de energia para produção de biomassa e de bioprodutos de alto valor agregado. O carbono inorgânico pode estar na forma de dióxido de carbono (CO_2), ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) ou carbonato (CO_3^{2-}) e suas concentrações irão depender do pH do meio em que estão sendo cultivadas (DERNER, 2006). A fonte de carbono orgânico mais usualmente utilizada no cultivo microalgal é a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (MIAO e WU, 2004; XU et al., 2006; WEI et al., 2009; LIANG et al., 2009).

Fontes alternativas de carbono têm sido estudadas, como CO_2 de combustão gerado em indústrias ou usinas termelétricas (BENEMANN, 1997), águas naturais alcalinas (COSTA et al., 2002), fontes orgânicas, como melão (ANDRADE e COSTA, 2008), acetato (HEREDIA-ARROYO et al., 2010), glicerol, (O'GRADY e MORGAN, 2011), hidrolisado de milho (XU et al., 2006) e resíduos da indústria açucareira (OLGUÍN et al., 1995).

2.1.3.2 Nitrogênio como nutriente no cultivo de microalgas

Segundo Lourenço (2006), o nitrogênio é um dos principais elementos para o desenvolvimento microalgal, podendo ser assimilado por meio de diversas fontes nitrogenadas tais como nitrogênio molecular (N_2), amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), ureia, aminoácidos, purinas e pirimidinas. Sendo assim, quando o suprimento de nitrogênio é abundante verifica-se aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células de microalgas. No entanto, quando as concentrações de nitrogênio são baixas é possível notar uma redução marcante da taxa de divisão celular, redução das

concentrações de proteína e clorofila e aumento do conteúdo lipídico nas células microalgais.

Diversos pesquisadores (XU et al., 2006; LIU et al., 2008; HSIEH e WU, 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011; WANG et al., 2012) estudando a influência da concentração de nitrogênio no teor lipídico de várias espécies de *Chlorella*, verificaram que a depleção deste nutriente favoreceu o acúmulo de material oleoso nas células de *Chlorella*.

2.1.4 Formas de condução do cultivo heterotrófico de microalgas

No cultivo heterotrófico de microalgas, o crescimento celular e a biossíntese de produtos são significativamente influenciados pelos nutrientes do meio de cultivo, principalmente carbono e nitrogênio e fatores ambientais (físico-químicos) tal como os citados anteriormente. Este tipo de cultivo pode ser conduzido em batelada (descontínuo), batelada alimentada, contínuo e contínuo com reciclo de célula (CHEN e CHEN, 2006).

O cultivo em modo batelada (descontínuo) é uma técnica muito utilizada em laboratório devido a sua simplicidade e baixo custo e serve para investigar os efeitos dos componentes do meio e fatores ambientais sobre a biomassa e rendimento do produto (CHEN, 1996).

No cultivo em batelada alimentada um nutriente do meio é adicionado continuamente ou intermitentemente durante o cultivo, e apresenta como vantagem a minimização das chances de saturação do substrato pela microalga (CHEN, 1996).

O modo contínuo é basicamente um método de prolongamento da fase de crescimento do micro-organismo que consiste na alimentação de nutrientes e ao mesmo tempo remoção do meio fermentado. O crescimento e fatores ambientais são mantidos constantes. É um sistema utilizado para o cultivo de micro-organismos heterotróficos e estudo do crescimento e comportamento fisiológico do micro-organismo (CHEN e CHEN, 2006).

O cultivo contínuo com reciclo de célula é raramente utilizado para cultivo heterotrófico (WEN e CHEN, 2003). Consiste na adição de nutrientes e retirada somente do meio de cultivo, pois as células ficam retidas no biorreator.

2.1.5 Lipídeos

Os lipídeos são um grupo de compostos quimicamente diversos que são solúveis em solventes orgânicos (KATES, 1986; DAMODARAN et al., 2010). Ocorrem frequentemente na natureza, são encontrados em lugares tão diferentes como na gema do ovo e no sistema nervoso humano. São importantes componentes de membranas vegetais, animais e microbianas. A definição de um lipídeo baseia-se na solubilidade. O lipídeo é uma mistura de compostos que compartilham algumas propriedades com base em semelhanças estruturais, principalmente uma preponderância de grupos apolares. A característica marcante dos lipídeos é a sua natureza apolar, que leva à sua insolubilidade em água (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

Os componentes principais dos lipídeos são os ácidos graxos, compostos que contêm uma cadeia alifática e um grupo ácido carboxílico. Ou seja, um ácido graxo é um lipídeo que contém uma extremidade carboxílica (cabeça polar) acoplada a uma cauda de hidrocarboneto (KATES, 1986; CAMPBELL e FARRELL, 2007). A maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural possui número par de carbonos em uma cadeia linear, devido ao processo biológico de alongamento da cadeia, no qual dois carbonos são adicionados de cada vez (DAMODARAN et al., 2010).

Os lipídeos em microalgas são tradicionalmente divididos em duas classes principais, baseado em suas características químicas: lipídeos neutros (também chamado de simples, ou não polar) e lipídeos polares (CHRISTIE, 2003; HUANG et al., 2010b). Lipídeos neutros incluem acilgliceróis (tri-, di- e monoacilgliceróis), ácidos graxos livres, ceras e lipídeos do tipo isoprenóides (por exemplo, carotenoides), estes são os menos polares dos lipídeos. Lipídeos polares incluem fosfolipídeos (por exemplo, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) e glicolipídeos (como combinações de oligossacarídeos e lipídeos) (KATES, 1986; HUANG et al., 2010b; GREENWELL et al., 2010). Uma subcategoria importante dos lipídeos polares são os glicolipídeos (por exemplo monogalactosil diglicerídeo), ésteres de ácidos graxos e glicerol, em que um dos grupos hidroxil do glicerol é combinado com uma molécula de açúcar (neste caso a galactose), para formar ligações éster com ácidos graxos (GREENWELL et al., 2010).

Lipídeos neutros têm como função principal em células de microalgas a armazenagem de energia, enquanto que lipídeos polares se agrupam paralelamente entre si para formar as membranas celulares da bicamada lipídica. Acilgliceróis consistem de ácidos graxos-ésteres ligado a um esqueleto de glicerol e é classificado de acordo com seu número de ácidos graxos: triacilgliceróis (TG), diacilgliceróis (DG) ou monoacilgliceróis (MG). Ácidos graxos livres são um tipo de ácido graxo ligado a um átomo de hidrogênio. Há também alguns tipos de lipídeos neutros que não contêm ácidos graxos, tais como hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos (carotenos e clorofilas). No entanto, estas frações lipídicas são também solúveis em solventes orgânicos, por isso se classificam na definição de lipídeos (HALIM et al., 2012).

O perfil lipídico é dependente da fase de crescimento da microalga, ou seja, fase exponencial ou estacionária. Lipídeos neutros são mais abundantes nas células de microalgas quando o cultivo encontra-se na fase estacionária de crescimento. Por outro lado, os lipídeos polares e os poli-insaturados aparecem em maior concentração na fase exponencial de crescimento microalgal (ALONSO et al., 2000).

Uma revisão da literatura sobre os lipídeos de microalgas, síntese e metabolismo de ácidos graxos, benefícios dos ácidos graxos ω 3 de origem microalgal, influência das condições de cultivo das microalgas na produção de lipídeos e perfil de ácidos graxos, está apresentada no item 3.2 (artigo 1, desta tese de doutorado, intitulado "Revisão: Microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos graxos essenciais").

2.1.6 Nanotecnologia e Nanobiotecnologia

A nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados, área estratégica para economias consolidadas e emergentes, promovendo uma competição tecnológica mundial (ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI-PASA, 2008).

Nanotecnologia é o passo posterior a miniaturização e está intimamente ligada a composição física dos produtos. Desde o tempo dos filósofos gregos paira sobre a humanidade a dúvida acerca da possibilidade de se chegar a estrutura formadora dos materiais, ou seja, ao elemento formador universal. A necessidade de se chegar ao “tijolo” fundamental de tudo o que existe ronda a ciência e mobiliza diversas áreas do

conhecimento, tais como matemática, química, física e biologia que, unidas, tentam não apenas conhecer em profundidade, mas também, manipular a estrutura básica de todos os materiais identificados pelo homem (PINA et al., 2005).

Pela reduzida escala em que atua esta tecnologia pode-se sintetizar a matéria da forma que for mais adequada à utilização desejada. Modifica-se o arranjo de átomos e moléculas visando-se um produto final mais resistente, mais barato, mais leve, mais preciso, mais puro e mais adequado. Neste sentido, potencialmente falando, a nanotecnologia possui o poder de revolucionar a forma com que se imagina, trata e manuseia a formação de materiais (PINA et al., 2005).

Já o termo nanobiotecnologia refere-se à fusão de duas abordagens de tecnologias, a biotecnologia e a nanotecnologia, apresentando enormes inovações e potencialidades. A nanobiotecnologia pode ser, portanto, definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico (PAULL et al., 2003; DURÁN et al., 2013). Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física-médica (diagnóstico), o desenvolvimento de nanofármacos (fármacos encapsulados), além da nanocosmectúca (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis) (DURÁN et al., 2013) e da nanotecnologia em alimentos.

2.1.7 Riscos e perspectivas da nanotecnologia

Nos últimos anos, muitos estudos vem sendo realizados no sentido de concretizar as novas ideias que surgem na área de nanotecnologia. Mesmo assim, apesar dos avanços alcançados, ainda há muito a ser feito. O impacto da nanotecnologia é bastante penetrante em diversas áreas, como materiais e fabricação, nanoeletrônica e tecnologia de computadores, medicina e saúde, aeronáutica e exploração espacial, energia e meio ambiente, biotecnologia e agricultura, segurança nacional, embalagens, etc (DURÁN et al., 2012).

A nanobiotecnologia já tem levado à produção de novos materiais e, como é bastante recente, os riscos para a saúde humana e ambiente ainda não estão suficientemente avaliados. A argumentação de uma parte do mundo científico é de que

os materiais nanoestruturados poderiam difundir-se descontroladamente no ambiente devido às suas dimensões muito reduzidas. Mas somente pesquisas minuciosas e os dados experimentais gerados podem avaliar os riscos e impactos. Como os benefícios que serão trazidos pela nanotecnologia não serão desprezados, restará a investigação criteriosa dos riscos (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Ao mesmo tempo em que os elementos em nanoescala apresentam novas propriedades que podem ser aproveitadas vantajosamente, também podem gerar tipos de toxicidade diferentes às conhecidas. Por isso, a regulamentação vigente não é adequada nem suficiente e novas avaliações são necessárias (FOLADORI e INVERNIZZI, 2007).

Em vista do grande número de produtos tecnológicos no mercado, o uso da nanotecnologia vem sendo amplamente discutido juntamente com a sociedade quanto a possíveis riscos como contaminação ao meio ambiente e mesmo de lançamento de produtos nano que apresente toxicidade elevada. Assim, as discussões recentes são concernentes ao emprego da nanotecnologia com responsabilidade social, incluindo o uso de “*green chemistry*”, que seria a geração de resíduos totalmente desprovidos de poluentes para o meio ambiente. Além disso, muito se tem focado no emprego de nanotecnologia como substituição de processos mais poluidores e no tratamento de efluentes empregando nanotecnologia (DURÁN et al., 2013).

Segundo Duran et al. (2013), a nanotecnologia apresenta-se hoje presente em vários aspectos do dia a dia, de maneira que não há mais como frear ou rejeitar essa nova tecnologia. O que resta é exigir uma profunda investigação e conhecimento desses novos produtos de maneira que venha trazer somente grandes benefícios para a sociedade.

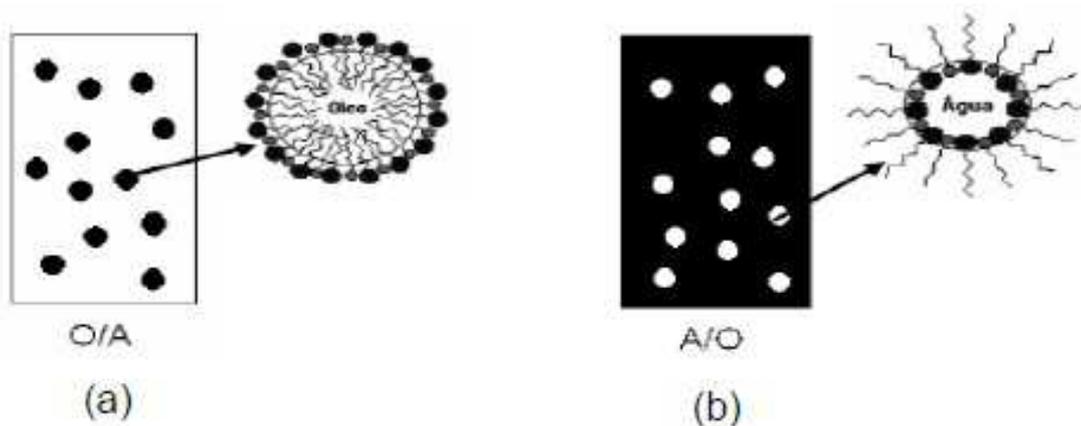
2.1.8 Nanoemulsões

As emulsões podem ser definidas como um sistema heterogêneo e termodinamicamente instável que consiste em pelo menos um líquido imiscível disperso em outro na forma de glóbulos ou gotículas (HOLMBERG et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2004). As emulsões não se formam espontaneamente, sendo que suas propriedades dependem não somente de condições termodinâmicas como também da

forma em que são preparadas, das características e ordem de adição dos componentes (LIN et al., 1975; PORRAS et al., 2004).

As emulsões podem ser classificadas como óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa ou água em óleo (A/O), quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas numa fase contínua oleosa (FORGIARINI et al., 2001), conforme mostra a Figura 2. Além disso, as emulsões são compostas por três fases distintas: oleosa, aquosa e emulsificante (agente tensoativo) (CAPEK, 2004).

Figura 2 - Representação esquemática dos glóbulos das emulsões óleo em água (a) e água em óleo (b)



Fonte: OLIVEIRA (2008).

Segundo Capek (2004), as emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela adição de agentes tensoativos ou surfatantes capazes de reduzir a tensão interfacial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno de glóbulos da fase interna. Um fator de extrema importância no desenvolvimento de emulsões é selecionar uma mistura de emulsificantes (tensoativos) ótima para cada fase dispersa.

O termo nanoemulsões (NEs) é frequentemente utilizado para designar emulsões com glóbulos ou gotículas da fase interna menores que 1000 nm (CAPEK, 2004; GUTIÉRREZ et al., 2008). No entanto, o tamanho das gotas nanométricas ainda é um assunto polêmico entre diversos pesquisadores.

As nanoemulsões, também conhecidas como miniemulsões ou emulsões submicrométricas, consistem em emulsões muito finas com glóbulos de diâmetro em escala nanométrica.

Segundo Capek (2004) as nanoemulsões podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho do glóbulo é inferior a 200 nm e aparência leitosa quando o tamanho do glóbulo está na faixa de 200-500 nm.

O tamanho reduzido das gotas confere estabilidade, evitando a sedimentação. A maturação ou envelhecimento de Ostwald é o mecanismo principal para a desestabilização de nanoemulsões, o qual surge da polidispersão de uma emulsão e da diferença de solubilidade e/ou dos potenciais químicos entre as partículas pequenas e grandes (KOURNIATIS et al., 2010).

2.1.8.1 Métodos de preparação de nanoemulsões

De acordo com Pey et al. (2006), as nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessário fornecimento de energia ao sistema. Sendo assim, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta ou baixa energia de emulsificação (TADROS et al., 2004; ACOSTA, 2009; LEONG et al., 2009; KOROLEVA e YURTOV, 2012) ou ainda uma combinação destes dois métodos (KOROLEVA e YURTOV, 2012).

Os métodos de alta energia de emulsificação utilizam dispositivos mecânicos capazes de gerar energia mecânica por meio de alta tensão de cisalhamento tais como os homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou método de sonicação (GUTIÉRREZ et al., 2008; VELIKOV e PELAN, 2008; WOOSTER et al., 2008; LEONG et al., 2009; KOROLEVA e YURTOV, 2012). A alta energia mecânica imposta ao sistema gera forças capazes de deformar ou quebrar gotículas da fase interna em glóbulos menores. Estas técnicas permitem melhor controle da granulometria e ampla escolha de constituintes (FERNANDEZ et al., 2004).

Alguns pesquisadores (BOUCHEMAL et al., 2004; TADROS et al., 2004; FREITAS et al., 2005; CHU et al., 2007; ANTON et al., 2008; YIN et al., 2009) relatam que os métodos de baixa energia de emulsificação dependem da formação espontânea de gotículas de óleo no interior de sistemas emulsificantes óleo-água quando a solução

ou as condições ambientais são alteradas, por exemplo, a inversão de fase e métodos de mistura de solventes. Isto é, este método faz uso de propriedades físico-químicas do sistema, e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para obtenção de glóbulos de tamanho reduzido.

2.1.9 Estabilidade das nanoemulsões

Segundo Aulton (2005), pode-se considerar que uma emulsão é estável quando tem-se um sistema no qual os glóbulos dispersos mantêm suas características iniciais, permanecendo uniformemente distribuídos pela fase contínua.

A propriedade física mais importante de uma emulsão é sua estabilidade, que depende essencialmente de três fenômenos: sedimentação, floculação e coalescência das gotículas dispersas causando a quebra da emulsão (SHAW, 1992).

A sedimentação resulta de uma diferença de densidade entre as duas fases e consiste na migração de uma das substâncias para o topo da emulsão, não sendo necessariamente acompanhada de floculação das gotas (SHAW, 1992). A floculação acontece quando os glóbulos se unem e o filme interfacial é mantido, ou seja, permanecem glóbulos inteiros distintos. A coalescência acontece quando há a união dos glóbulos e a ruptura da interface, formando um glóbulo maior. Este processo é irreversível e quando um grande número de glóbulos coalescem, o resultado é a separação de fases (CAPEK, 2004).

Segundo Capek (2004), um dos maiores problemas de instabilidade relacionados às nanoemulsões, é o chamado fenômeno de "Ostwald ripening", no qual resulta da diferença de solubilidade entre os glóbulos, pois quanto maior a curvatura interfacial do glóbulo em dispersão, maior a área de superfície da fase dispersa e conseqüentemente maior a solubilidade do conteúdo da fase dispersa na fase contínua. Este fator pode causar a movimentação de moléculas de óleo através de difusão passiva ou transporte assistido por micelas. Essas moléculas são transferidas dos glóbulos pequenos para os maiores, provocando alteração da granulometria da fase dispersa.

A estabilidade de uma emulsão pode ser mensurada através do tamanho dos glóbulos da fase interna da emulsão e a magnitude do potencial zeta (MORAIS et al., 2006). Além disso, através da análise granulométrica é possível determinar o índice de

polidispersividade da emulsão e, quanto mais polidisperso for o sistema maior é a susceptibilidade à ocorrência do fenômeno "Ostwald ripening" (CAPEK, 2004).

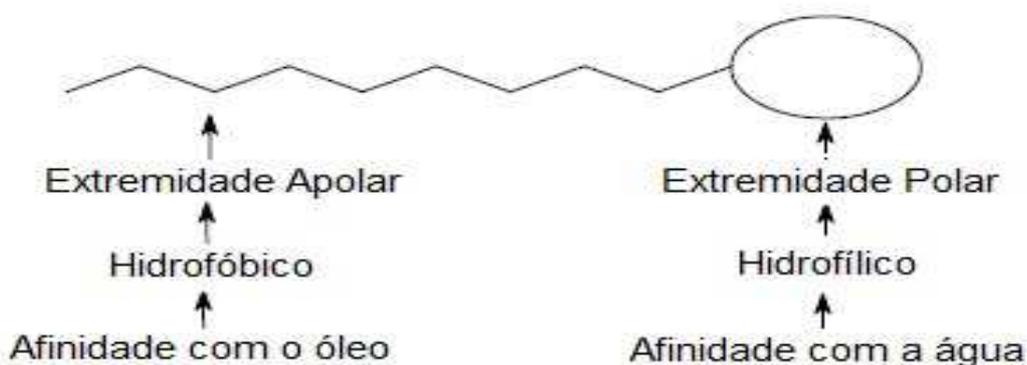
Outro fator importante na medida da estabilidade de uma emulsão é o pH. Quando ocorre alteração no valor de pH, isto indica que estão ocorrendo reações químicas que podem acabar comprometendo a qualidade da emulsão e conseqüentemente alterar sua estabilidade. Por exemplo, quando utiliza-se óleos vegetais na formulação de emulsões, a diminuição do valor do pH pode estar indicando a ocorrência de hidrólise de ésteres de ácidos graxos (MARTINI, 2005).

2.1.10 Tensoativos

Segundo Hunter (1993) e Daltin (2011), tensoativos são definidos como substâncias naturais ou sintéticas, que possuem em sua estrutura uma parte lipofílica (ou hidrofóbica) e uma parte hidrofílica (Figura 3), responsáveis pela adsorção de moléculas tensoativas nas interfaces líquido-líquido, líquido-gás ou sólido-líquido de um dado sistema.

Os tensoativos são moléculas anfifílicas que se adsorvem na interface entre a fase dispersa e contínua durante o processo de emulsificação e podem prontamente prevenir fenômenos como floculação e coalescência (BROOKS, 1998).

Figura 3 - Representação esquemática de um tensoativo



Fonte: ROSSI et al. (2006).

Agentes tensoativos (ou surfatantes) quando na presença de água e óleo adsorvem-se nas interfaces, devido às suas estruturas e propriedades, orientando-se de

forma que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase oleosa, formando um filme molecular ordenado nas interfaces, que reduz as tensões interfacial e superficial (HUNTER, 1993; PROSSER e FRANCES, 2001).

Além disso, os tensoativos podem ser classificados em iônico (aniônico e catiônico), não iônico (HOLMBERG, 2003; DALVIN, 2011) e zwitteriônicos (ou anfóteros) (HOLMBERG, 2003), conforme apresentado abaixo:

- Tensoativos iônicos: apresentam cargas elétricas na parte hidrofílica, ao se dissociarem em água, formando íons carregados negativamente (tensoativos aniônicos) ou positivamente (tensoativos catiônicos).

Os tensoativos aniônicos mais conhecidos são os alquil alcanoatos (ou sabões) que são derivados de gorduras animais, ou óleos vegetais, por reações de saponificação. Dentre os catiônicos destacam-se sais de amônio quaternários (solúveis tanto em meio ácido como em meio alcalino, proporcionando aumento de viscosidade e ação bactericida) e aminas de cadeias longas (utilizadas como óleos lubrificantes, como inibidores de corrosão em superfícies metálicas e como coletores de flotação na indústria de minérios).

- Tensoativos não iônicos: não fornecem íons em solução aquosa e a sua solubilidade em água se deve à presença, em suas moléculas, de grupamentos funcionais que possuem forte afinidade pela água. Exemplos: nonilfenol etoxilado, álcoois graxos etoxilados, propilenoglicoletoxilado e Tween®80. O Tween®80 ou polisorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) é um surfatante não iônico utilizado para emulsificar óleo em água (FENG et al., 2006). Além disso, é muito conhecido e disponível comercialmente (BARWICZ et al., 1992). Nos Estados Unidos, o Tween®80 é comumente utilizado como aditivo alimentar. Este tensoativo quando ingerido é degradado em gorduras e absorvido no jejuno (KAMANDE et al., 2000). Também é utilizado no preparo de rações para animais, sendo reconhecidamente seguro. Para ruminantes é indicada a sua utilização já que ele aumenta potencialmente a atividade da protease e a degradação da celulose, aumentando a utilização do alimento, o que aumenta o desempenho do animal (JIN et al., 2007).

- Tensoativos zwitteriônicos contêm dois grupos carregados de cargas opostas. Quase sempre, o grupamento que traz a carga positiva é um derivado de amônio e o que traz a carga negativa pode variar, sendo o mais comum o carboxilato.

Tensoativos zwitteriônicos são, às vezes, chamados de anfóteros, mas os termos não são idênticos. Os tensoativos zwitteriônicos apresentam os dois grupos polares aniônico e catiônico ao mesmo tempo na molécula, já os tensoativos anfóteros são aqueles que se comportam como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH do meio, alguns podendo ser considerados zwitteriônicos em determinadas faixas de pH.

Os tensoativos, surfatantes e biossurfatantes têm a mesma definição, no entanto o biossurfatante é de origem biológica enquanto que o tensoativo e o surfatante são de origem química.

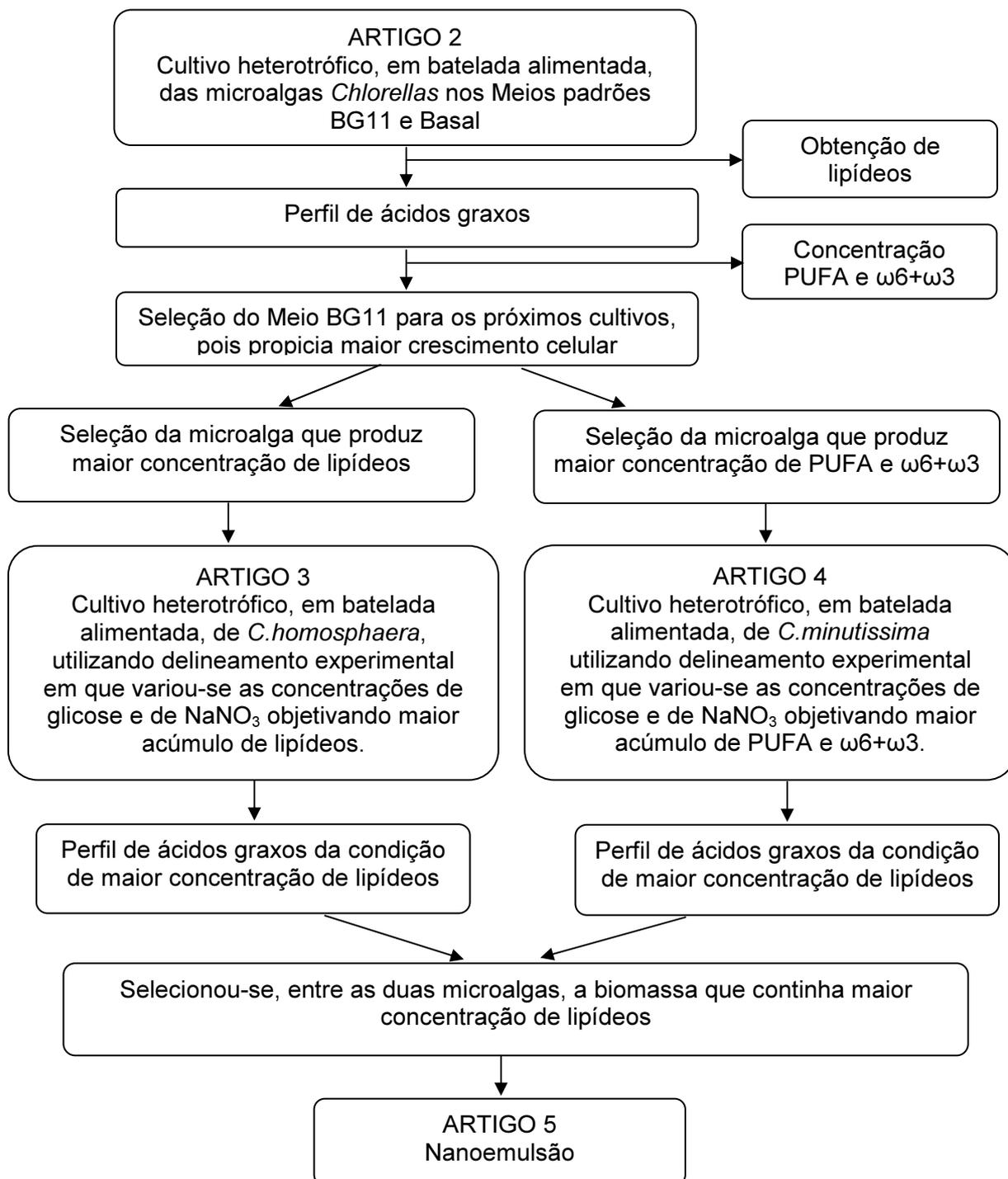
Uma grande quantidade de compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, que vão desde saponinas (plantas), glicolipídeos (micro-organismos) e sais biliares (humanos) (BOGNOLO, 1999).

Mendes et al. (2006) relatam a produção de compostos como glicolipídeos, fosfolipídeos e lipídeos neutros, por microalgas, que podem ser classificados como biossurfatantes, porém mencionam que não foram testados para serem utilizados como biossurfatantes.

CAPITULO III - Desenvolvimento do Trabalho

3.1 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO - ARTIGOS

O trabalho foi dividido em cinco artigos sendo o Artigo 1 de revisão, aceito para publicação na Revista de Ciências Agrárias (Lisboa). A partir do Artigo 2 apresenta-se o trabalho experimental desenvolvido, conforme fluxograma abaixo:



3.2 ARTIGO 1 - REVISÃO: MICROALGAS: UMA FONTE ALTERNATIVA NA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Shana Pires Ferreira¹, Leonor de Souza-Soares², Jorge Alberto Vieira Costa¹

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

² Laboratório de Ciência de Alimentos (LCA), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

shanaferreira@gmail.com (autor para correspondência); leonor.souza-soares@gmail.com; jorgealbertovc@terra.com.br

3.2.1 RESUMO

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes de grande importância, uma vez que sintetizam biocompostos de alto valor agregado. Os ácidos graxos de microalgas podem ser produzidos tanto de forma autotrófica quanto heterotrófica e sua síntese ocorre no cloroplasto. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma breve revisão sobre os ácidos graxos poli-insaturados produzidos por microalgas, enfatizando a influência das condições de cultivo das microalgas, síntese e metabolismo para a produção de ácidos graxos. Esta revisão aborda alguns trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) e, enfoca os seguintes itens: microalgas, conteúdo lipídico das microalgas, síntese e metabolismo de ácidos graxos, influência das condições de cultivo das microalgas na produção de lipídeos e perfil de ácidos graxos.

PALAVRAS CHAVE: Ácidos graxos essenciais, condições de cultivo, microalgas, teor de lipídeos.

3.2.2 ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic micro-organisms of great importance, since they have the ability of synthesize high value biocompounds. Fatty acids of microalgae can be produced both by autotrophic and heterotrophic pathways, and is synthesized in the chloroplast. The aim of this study is to perform a brief review of the polyunsaturated fatty acids produced by microalgae, emphasizing the influence of culture conditions, synthesis and metabolism for the production of fatty acids. This review discusses some of the work undertaken by the group LEB, and focuses on the following items: microalgae, microalgae lipid content, fatty acid synthesis and metabolism, influence of culture conditions of microalgae for the production of lipids and fatty acid profile.

KEY WORDS: Culture conditions, essential fatty acids, lipid content, microalgae.

3.2.3 INTRODUÇÃO

O estudo de micro-organismos como microalgas, alguns fungos (leveduras, por exemplo) e bactérias, deve-se à essencial importância desses nas diversas cadeias tróficas. Além disso, na possibilidade de aplicação no setor produtivo de diversas áreas como: nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas dentre outras (GROBBELAAR, 2004; RICHMOND, 2004).

O crescimento de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. A composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie algal, de fatores como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e concentração de CO₂ (MIAO e WU, 2004).

Os ácidos graxos reconhecidos pela WHO (World Healthy Organization) como essenciais são o linoléico (C18:2 ω6), α-linolénico (C18:3, ω3), γ-linolénico (GLA, 18:3 ω6) e araquidônico (AA, 20:4 ω6) (ALONSO e MAROTO, 2000). O ácido γ-linolénico, apesar de ser sintetizado a partir do ácido linoléico, é considerado como essencial por existirem evidências da perda desta capacidade de biossíntese com o

envelhecimento. O ácido araquidônico é sintetizado a partir da dessaturação do ácido γ -linolénico (MURRAY et al., 2002).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são obtidos de fontes vegetais e são nutrientes essenciais da dieta de tecidos animais, devido à capacidade limitada de dessaturação destes tecidos. Estes ácidos graxos essenciais originam os ácidos graxos eicosanóicos (C₂₀), que por sua vez irão dar origem a famílias de compostos conhecidos como eicosanóides (MURRAY et al., 2002).

Os PUFAs de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais (PULZ e GROSS, 2004; BERTOLDI et al., 2008). Lipídeos, especialmente ácidos graxos insaturados, têm sido encapsulados visando diminuir a susceptibilidade à oxidação (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma breve revisão sobre os ácidos graxos poli-insaturados produzidos por microalgas enfatizando a influência das condições de cultivo das microalgas, síntese e metabolismo para a produção de ácidos graxos, bem como seus aspectos nutricionais.

3.2.4 MICROALGAS

A denominação microalgas inclui organismos com dois tipos de estrutura celular: procariótica e eucariótica. Os procarióticos têm representantes nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*. Já os eucarióticos possuem representantes nas Divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xanthophyceae* etc.), *Cryptophyta* e *Dinophyta* (DERNER et al., 2006).

Microalgas crescem autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono, e também podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, usando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico. Nesse sistema usam-se, simultaneamente, a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Muitas microalgas têm demonstrado facilidade em crescer rapidamente em cultivos heterotróficos. Geralmente, um organismo utilizado para produção heterotrófica deve possuir as seguintes características: (1) habilidade para se dividir e metabolizar na ausência de luz; (2) possibilidade de crescer em meio de baixo custo; (3) facilidade para se adaptar rapidamente em novos ambientes e (4) capacidade para resistirem a stress hidrodinâmico na fermentação (WEN e CHEN, 2003). Algumas diatomáceas demonstraram serem capazes de produzir ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω 3) quando cultivadas de modo heterotrófico (WEN, 2001).

As microalgas são cultivadas de forma contínua em curto tempo, requerendo pequenas áreas para seu cultivo, cuidados simples, tais como: reposição mineral, controle de pH, luminosidade, sendo que uma das principais vantagens é que em seu cultivo as mesmas dispensam a utilização de agrotóxicos (BERTOLDI et al., 2008). Além disso, as microalgas podem utilizar CO₂ como fonte de carbono para se multiplicarem e produzirem compostos de interesse. Assim, auxiliam na diminuição dos níveis de CO₂ do ar, os quais são responsáveis pelos efeitos do aquecimento global. A biomassa produzida pode ser utilizada como alimento ou como fonte de biocompostos. Os ácidos graxos, quando extraídos, podem ser utilizados como alimento, fármacos, ou transformados em biocombustíveis (RADMANN e COSTA, 2008).

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006a). Muitas microalgas são utilizadas para produção de alimentos por produzirem diversas substâncias, como vitaminas, sais minerais, pigmentos, lipídeos e ácidos graxos (MORAIS e COSTA, 2008).

As principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas ocorrem no enriquecimento de rações para peixes, produção de biodiesel e fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana (MORAIS e COSTA, 2008). Mata et al. (2010) apresentam uma relação das diferentes espécies de microalgas e seu conteúdo em lipídeos (Tabela 1).

Tabela 1 - Conteúdo lipídico e suas respectivas produtividades para diferentes espécies de microalgas

Espécies de Microalgas	Conteúdo lipídico (% de biomassa seca)	Produtividade lipídica (mg.L ⁻¹ .d. ⁻¹)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24,0–31,0	-
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0–75,0	-
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6–16,4/39,8	17,6
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0–63,0	10,3-50,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6–57,8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0–22,0	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0–58,0	11,2-40,0
<i>Chlorella</i>	18,0–57,0	-
<i>Chlorella</i> sp.	10,0 – 48,0	18,7
<i>Chlorococcum</i> sp.	19,3	53,7
<i>Dunaliella salina</i>	6,0–25,0	116,0
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7–71,0	-
<i>Dunaliella</i> sp.	17,5–67,0	33,5
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27,4	47,3
<i>Euglena gracilis</i>	14,0–20,0	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	-
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0–40,0	-
<i>Isochrysis</i> sp.	7,1–33	37,8
<i>Monallanthus salina</i>	20,0–22,0	-
<i>Nannochloris</i> sp.	20,0–56,0	60,9-76,5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7–29,7	84,0-142,0
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12,0–53,0	37,6-90,0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0–65,0	90,0-134,0

Continuação da Tabela 1

<i>Nitzschia</i> sp.	16,0–47,0	-
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	49,4
<i>Pavlova salina</i>	30,9	40,2
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	44,8
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0–57,0	34,8
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0–18,8/60,7	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0–55,0	35,1
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9–18,4	40,8-53,9
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6–21,1	26,3
<i>Skeletonema</i> sp.	13,3–31,8	17,4
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5–51,3	-
<i>Spirulina platensis</i>	4,0–16,6	-
<i>Spirulina maxima</i>	4,0–9,0	17,4
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	27,0-36,4
<i>Tetraselmis</i> sp.	12,6–14,7	43,4

Fonte: MATA et al. (2010).

3.2.5 LIPÍDEOS DE MICROALGAS

Nos sistemas biológicos, os lipídeos funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e como fonte de energia, sendo grande parte deles constituída de ácidos graxos. Sendo assim, os lipídeos se classificam em: lipídeos de armazenamento (lipídeos neutros), triacilgliceróis (TAG) e lipídeos de membrana (lipídeos polares), fosfolipídeos, glicolipídeos e esteróis (NELSON e COX, 2011). Uma subcategoria importante dos lipídeos polares é constituída pelos glicolipídeos (por exemplo, monogalactosil diglicerídeo - MGDG), ésteres de ácidos graxos e glicerol, em que um dos grupos hidroxila do glicerol é combinado com uma molécula de açúcar (neste caso galactose) para formar ligações éster com ácidos graxos (GREENWELL et al., 2010).

Os triacilgliceróis podem ser considerados a principal fonte energética da maioria dos organismos (NELSON e COX, 2011).

Os ácidos graxos são unidades fundamentais da maioria dos lipídeos. São ácidos orgânicos de cadeia longa, possuindo de 4 a 24 átomos de carbono; possuindo um grupo carboxila único e uma “cauda” hidrocarbonada não-polar, que confere à maioria dos lipídeos a sua natureza oleosa e gordurosa, insolúvel em água. Os ácidos graxos não ocorrem nas células ou tecidos numa forma não-combinada ou livre, mas sim em formas covalentemente ligadas a diferentes classes de lipídeos, a partir dos quais eles podem ser liberados por hidrólise química ou enzimática. Diferentes ácidos graxos têm sido isolados de lipídeos de várias espécies. Eles diferem entre si pela extensão da cadeia e sua presença, número e posição de duplas ligações; alguns ácidos graxos possuem também grupos metil ramificados (NELSON e COX, 2011).

Os glicolipídeos que são constituídos de glicerol têm sido encontrados em muitos organismos. No entanto, enquanto que em animais são encontrados em pequenas concentrações, são os constituintes majoritários de outros micro-organismos e o componente lipídico principal das membranas fotossintéticas de algas, incluindo as cianobactérias (algas verde azuladas) e plantas. A sua estrutura é análoga a dos glicerofosfolipídeos com uma molécula de açúcar ligada glicosidicamente à posição três do glicerol e ácidos graxos esterificados nas outras duas posições. Os principais glicosilacilgliceróis das membranas fotossintéticas de algas e plantas são (GURR et al., 2002):

- Monogalactosil-diacilglicerol (MGDG): especialmente abundante em plantas e algas, principalmente nos cloroplastos. Contém elevadas proporções de ácidos graxos poli-insaturados. Para *Chlorella vulgaris*, o MGDG apresenta principalmente ácido oléico (C18:1) e ácido linoléico (C18:2) quando cultivada no escuro, e 20 % de ácido linolénico (C18:3) quando cultivada na luz.

- Digalactosil-diacilglicerol (DGDG): usualmente encontrados juntamente com MGDG nos cloroplastos de plantas superiores e algas. Não são tão abundantes quanto os MGDG, mas apresentam elevadas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente ácido linolénico (C18:3).

- Sulfoquinovosil-diacilglicerol (SQDG): contém ácidos graxos saturados, principalmente o ácido palmítico (C16:0).

Os lipídeos podem ser encontrados em algas, constituindo, principalmente, duas frações: lipídeos neutros e lipídeos polares. Para o caso da microalga *Spirulina platensis*, os lipídeos polares são compostos de MGDG, DGDG, sulfoquinovosil diacilglicerol e fosfatidilglicerol. A fração neutra consiste, principalmente, de pigmentos (PIORRECK et al., 1984).

Os ácidos graxos nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os PUFAs representam entre 35 e 60 % dos lipídeos totais (RICHMOND, 1986). A estimativa de produção de lipídeos por microalgas varia de 15.000 a 30.000 L. km⁻² e a extração é simples, podendo serem aplicados os métodos tradicionais usados na indústria química, incluindo a extração por solventes (hexano) (RADMANN e COSTA, 2008).

3.2.6 SÍNTESE E METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

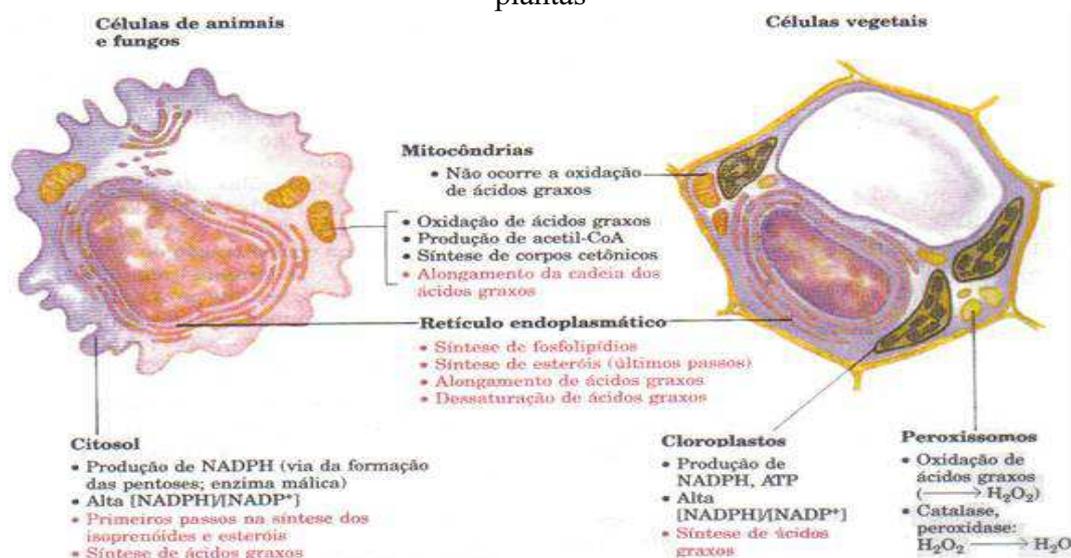
Os ácidos graxos podem ser obtidos na dieta ou produzidos pelo próprio organismo, em um processo chamado de lipogênese. Contudo, existe um grupo de ácidos graxos chamados ácidos graxos essenciais (AGE), que não são sintetizados pelo organismo devido à ausência das enzimas insaturases específicas, responsáveis pela formação das duplas ligações nestes compostos e, por isso, estes devem ser ingeridos através da dieta (CURI et al., 2002).

Várias espécies de microalgas vêm sendo cultivadas visando a obtenção de compostos considerados nutracêuticos, como os ácidos graxos poli-insaturados EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico) (GILL e VALIVETY, 1997). A maior parte das algas, fungos, bactérias, musgos, insetos e alguns invertebrados possuem as insaturases e elongases requeridas para a síntese de vários ácidos graxos poli-insaturados (CHIOU et al., 2001). O peixe, usualmente, obtém o EPA através da acumulação na cadeia alimentar. Muitos esforços têm sido realizados para desenvolver tecnologias adequadas para produção deste ácido graxo de microalgas (LEBEAU e ROBERT, 2003; GRIMA et al., 2003). Ao contrário, plantas e animais superiores têm deficiências das enzimas necessárias e, raramente, apresentam PUFAs acima de 18 carbonos (GILL e VALIVETY, 1997).

A síntese dos ácidos graxos ocorre no citosol de muitos organismos, mas nos vegetais fotossintéticos e microalgas ela ocorre no estroma do cloroplasto (Figuras 1 e 2). Esta localização justifica-se quando o NADPH é produzido nos cloroplastos pelas reações de luz da fotossíntese (NELSON e COX, 2011).

Todos os sistemas biológicos, incluindo os micro-organismos, insetos, plantas superiores e animais, são capazes de fazer a “síntese *de novo*” de ácidos graxos, partindo do acetato formando uma cadeia curta de ácidos graxos, com o ácido oléico (C18:1 ω 9) como o maior produto. A biossíntese tem início com a carboxilação de acetil CoA para formar acetato ou piruvato pela ação de enzimas glicolíticas. Então, a acetil CoA é convertida a malonil CoA, sendo esta reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (Figura 2), a qual é utilizada a fim de direcionar a reação de condensação para estender os grupos acil a ácido esteárico (C18:0 ω 9) e uma insaturase forma o ácido oléico (C18:1 ω 9) (WEN e CHEN, 2003). Os vegetais têm outros meios de obter o acetil CoA necessário para a síntese de ácidos graxos. Eles produzem acetil CoA a partir do piruvato, empregando uma isozima estromal da piruvato desidrogenase (NELSON e COX, 2011).

Figura 1 - Localização subcelular do metabolismo lipídico. As células de leveduras e de vertebrados diferem das células dos vegetais superiores na compartimentalização do metabolismo lipídico. A síntese dos ácidos graxos ocorre em compartimentos em que NADPH está disponível para síntese redutora (ou seja, onde a relação $[NADPH]/[NADP^+]$ é alta) : o citosol nos animais e nas leveduras, e os cloroplastos nas plantas

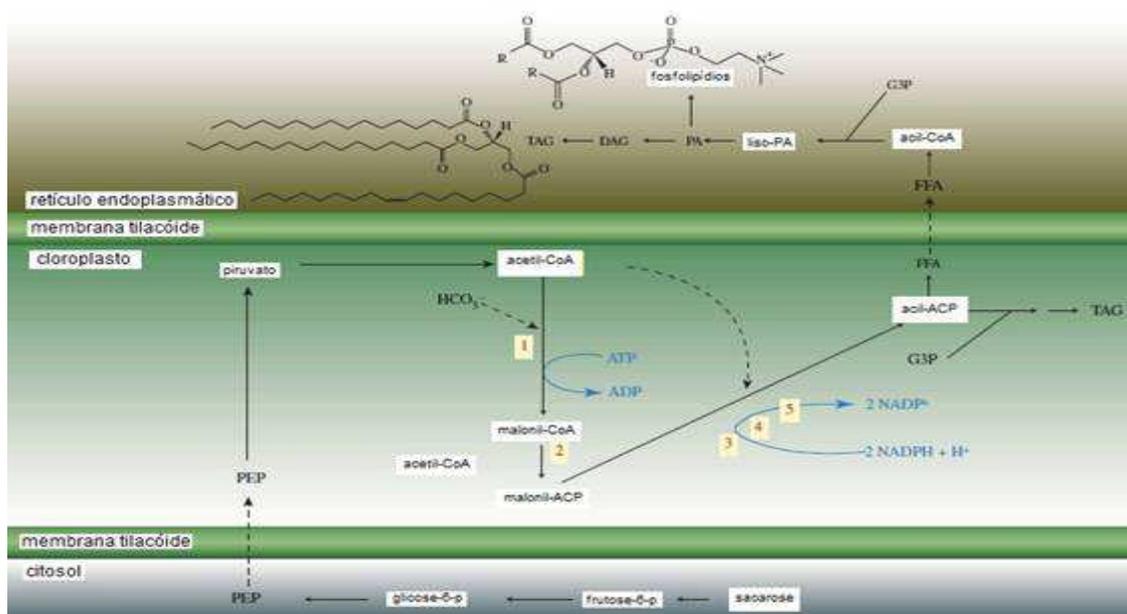


Fonte: NELSON e COX (2011).

A composição de ácidos graxos essenciais (AGE) difere muito entre organismos terrestres e aquáticos. Nos tecidos de animais terrestres, prevalecem os ácidos graxos pertencentes à família $\omega 6$, principalmente, ácido linoléico (C18:2) e ácido araquidônico (AA, C20:4). Nos organismos aquáticos, ocorre a predominância dos ácidos graxos da família $\omega 3$, tanto para espécies marinhas como de água doce (TARLEY et al., 2004).

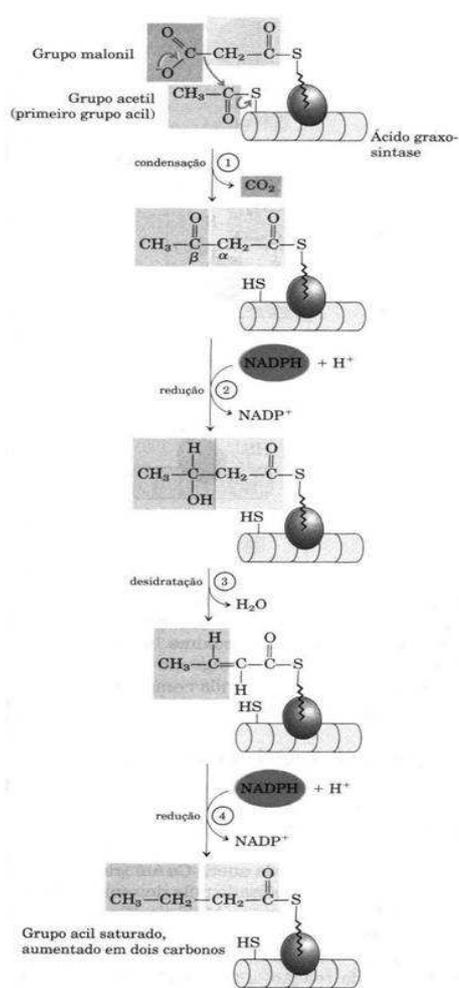
Na biossíntese dos ácidos graxos e dos eicosanóides, um intermediário de três átomos de carbono, o malonil-CoA é sintetizado a partir do acetil-CoA sendo esta reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (Figura 2). Os ácidos graxos são sintetizados por uma sequência repetitiva de reações. As longas cadeias carbônicas dos ácidos graxos são montadas em uma sequência repetitiva de reações com quatro passos (Figura 3).

Figura 2 - Visão global da via de síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA via acetil-CoA carboxilase. Reações enzimáticas envolvidas: (1) acetil-CoA carboxilase; (2) malonil-CoA: ACP transferase; etapas 3-5, reações de condensação subsequentes catalizadas pela (3) 3-cetoacil ACP redutase; (4) 3-hidroxiacil ACP desidrase e (5) enoil ACP redutase. ACP, proteína transportadora de grupos acil; FFA, ácidos graxos livres; G3P, glicerol-3-fosfato; liso-PA, ácido- liso fosfatídico; TAG, triacilglicerol; DAG, diacilglicerol



Fonte: Adaptado de GREENWELL et al. (2010).

Figura 3 - Adição de dois carbonos a uma cadeia acil graxo em crescimento: uma sequência de quatro etapas

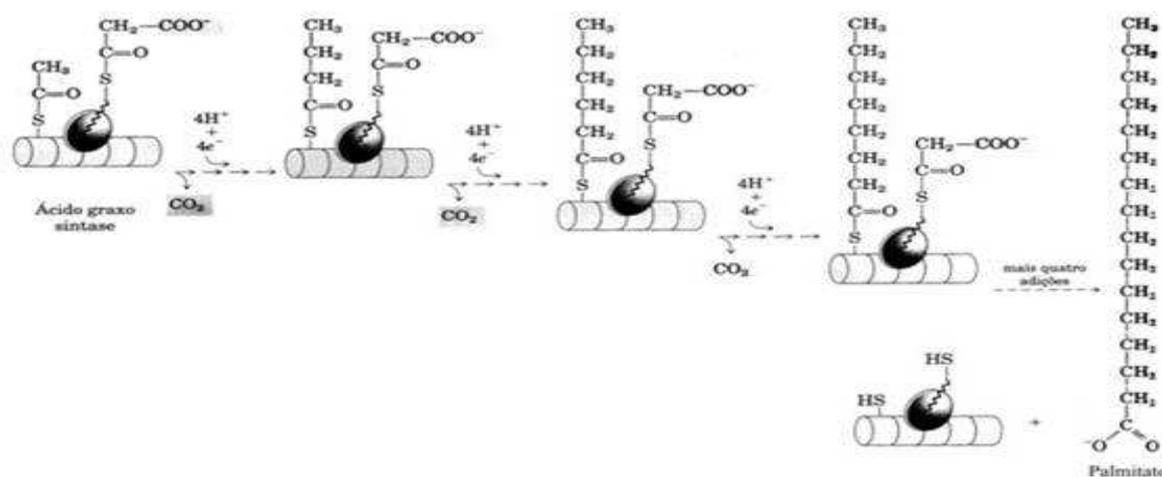


Fonte: NELSON e COX (2011).

Cada grupo malonil e acetil (ou um acil maior) é ativado por um tioéster que se une ao ácido graxo sintase (complexo multienzimático). O primeiro passo é a condensação de um grupo acil ativado (um grupo acetil é o primeiro grupo acil) com dois átomos de carbono derivados do malonil-CoA, com a eliminação do CO₂ do grupo malonil; o resultado líquido final é o aumento de dois átomos de carbono na cadeia do grupo acil. O produto β-ceto dessa condensação é então reduzido em três passos subsequentes muito idênticos às reações da β-oxidação, mas na sequência inversa. No segundo passo, o grupo β-ceto é reduzido a um álcool. No terceiro passo, a eliminação de H₂O cria uma dupla ligação e no quarto e último passo, a dupla ligação é reduzida para formar o grupo acil-graxo saturado correspondente.

O grupo acil saturado produzido durante este conjunto de reações se transforma no substrato de uma nova condensação com o grupo malonil ativado. Cada uma das passagens através do ciclo aumenta a cadeia do grupo acil graxo de dois átomos de carbono. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos, o produto formado (o palmitato, C16:0) abandona o ciclo. Os átomos de carbono constituindo os grupos metila e carboxila do grupo acetil tornam-se, respectivamente, C-16 e C-15 do palmitato; os átomos de carbono restantes são derivados da acetil-CoA via malonil-CoA (Figura 4).

Figura 4 - O processo global da síntese do palmitato

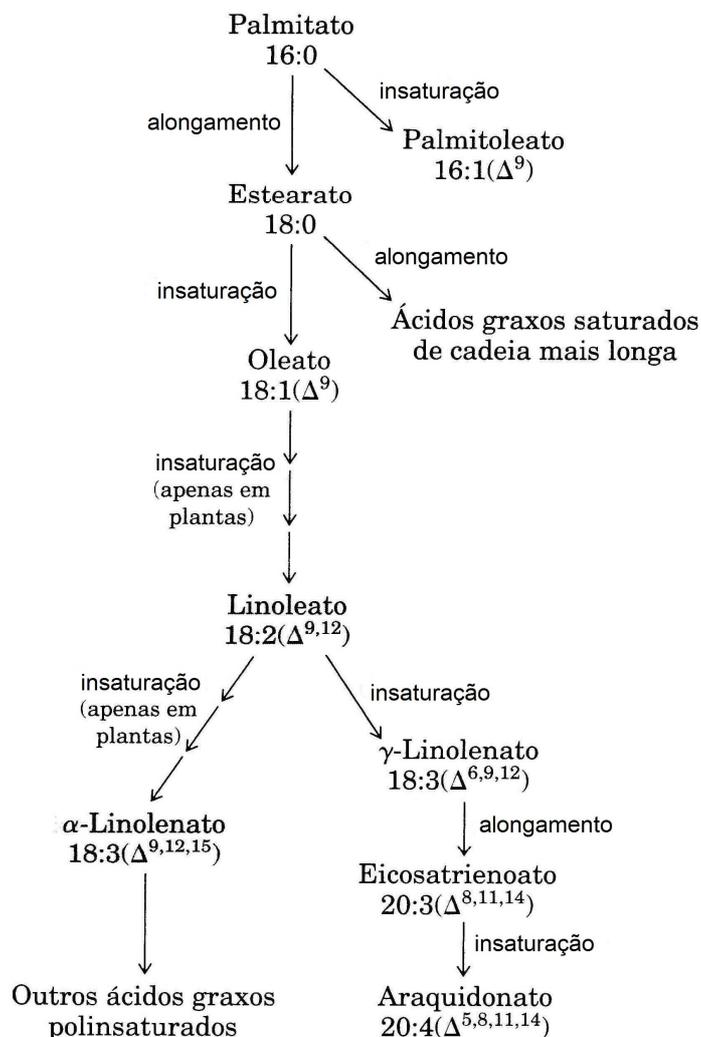


FONTE: Nelson e Cox (2011).

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do palmitato (Figura 5). Este pode ser aumentado, tanto para formar o estearato (C18:0) quanto ácidos graxos saturados ainda menores, por adições posteriores de grupos acetil, por meio da ação dos sistemas de alongamento dos ácidos graxos presentes no retículo endoplasmático liso e na mitocôndria. O sistema de alongamento mais ativo do retículo endoplasmático aumenta a cadeia de 16 carbonos do palmitoil-CoA de dois carbonos, formando estearoil-CoA. Embora diferentes sistemas enzimáticos estejam envolvidos, e a coenzima A, e não a ACP (proteína transportadora de grupos acil), seja o transportador de acil diretamente envolvido na reação, o mecanismo de alongamento é idêntico àquele empregado na síntese do ácido palmítico: a doação de dois carbonos

pelo malonil-ACP, seguida, por redução, desidratação e redução ao produto saturado com 18 átomos de carbono, o estearoil-CoA.

Figura 5 - Vias de síntese de outros ácidos graxos



Fonte: NELSON e COX (2011).

O palmitato (C16:0) e estearato (C18:0) servem como precursores dos dois ácidos graxos monoinsaturados, o palmitoleato (C16:1 Δ^9) e o oleato (C18:1 Δ^9) (NELSON e COX, 2011). As duplas ligações adicionais introduzidas nos ácidos monoinsaturados estão sempre separadas pelo grupo metileno, exceto nas bactérias. Nos animais superiores as duplas ligações adicionais são todas introduzidas entre a dupla ligação existente e o grupo carboxila; porém, nas plantas superiores elas podem ser

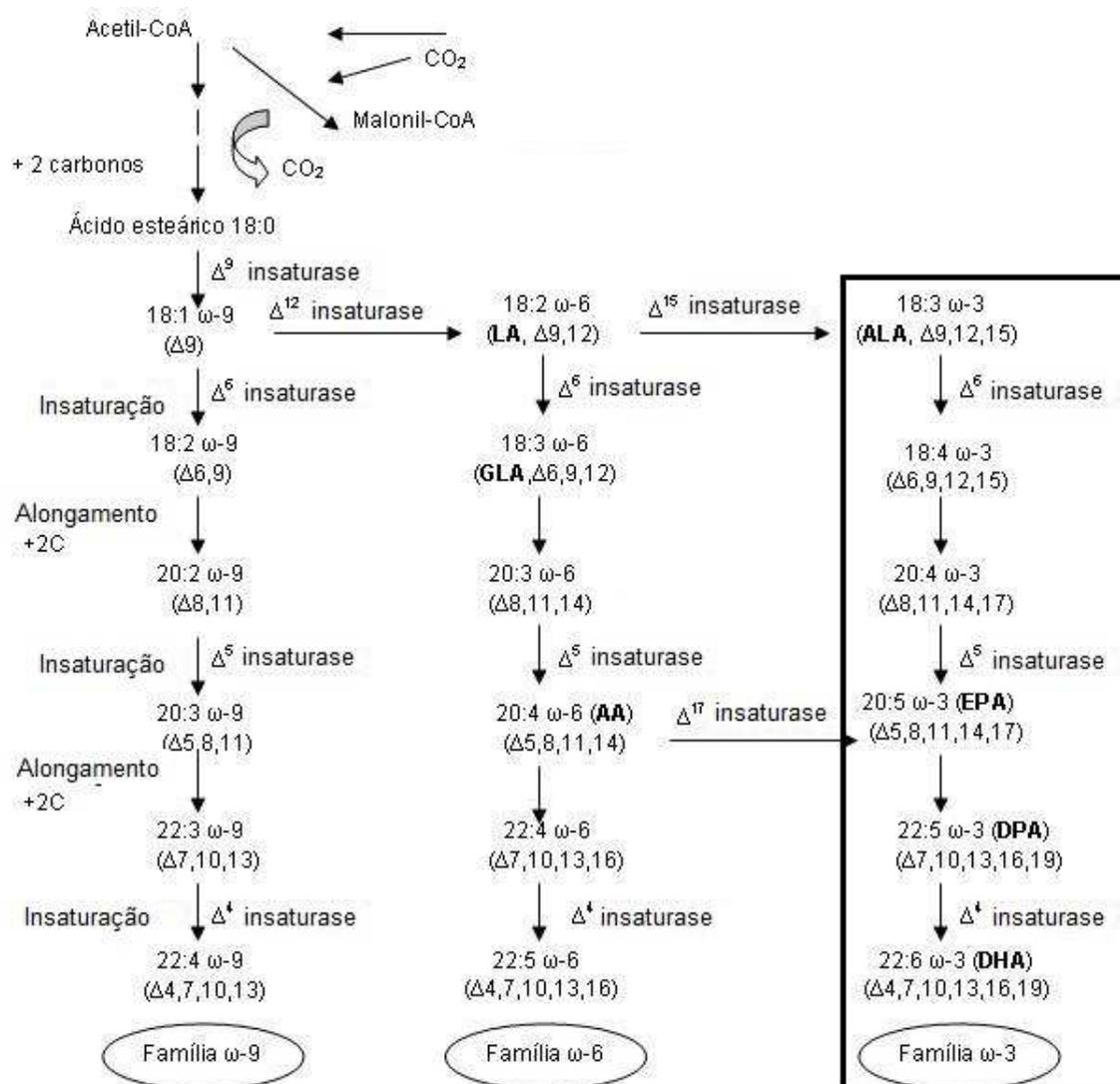
introduzidas entre a dupla ligação existente e o carbono ω (metil terminal) (MURRAY et al., 2002).

Os ácidos graxos das famílias $\omega 9$, $\omega 6$ e $\omega 3$ são formados a partir dos precursores oleato (ácido oléico, C18:1 Δ^9), linolenato (ácido linoléico C18:2, $\Delta^{9,12}$) e α -linolenato (ácido α – linolénico, C18:3 $\Delta^{9,12,15}$), respectivamente, e de uma série de reações de dessaturação e alongamento que pode ser verificado com detalhes na Figura 6. O ácido oléico (C18:1 $\omega 9$) é insaturado por uma insaturase Δ^{12} para formar o ácido linoléico (C18:2 $\omega 6$) e uma insaturase Δ^{15} para formar o ácido α -linolénico (C18:3 $\omega 3$). Em especial, a biossíntese dos ácidos graxos da família $\omega 3$ tal como o EPA ocorre através de uma série de reações, a qual pode ser dividida em 2 etapas distintas. A primeira é a síntese “*de novo*” do ácido oléico (C18:1 $\omega 9$) a partir de acetato. Esta etapa é seguida pela conversão do ácido oléico em ácido linoléico (LA, C18:2 $\omega 6$) e ácido α -linolénico (ALA, C18:3 $\omega 3$) (WEN e CHEN, 2003). Este último é insaturado por uma insaturase Δ^6 , formando o ácido estearidonico (ETE, C18:4 $\omega 3$). A seguir ocorre um alongamento da cadeia com adição de 2 átomos de carbono formando o ácido eicosatetraenoico (ETA, C20:4 $\omega 3$). Este, por sua vez, é insaturado por uma insaturase Δ^5 , formando o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega 3$). Após nova reação de alongamento forma-se o ácido graxo docosapentaenoico (DPA, C22:5 $\omega 3$) que é insaturado por uma insaturase Δ^4 , formando o ácido docosaexanoico (DHA, C22:6 $\omega 3$). A biossíntese das três famílias de ácidos graxos é mostrada na Figura 6.

As três fontes de ácidos graxos (ácidos oléico, linoléico e linolênico) competem pela insaturase Δ^6 . A afinidade da enzima pelo substrato e o total de substrato disponível determina qual o caminho metabólico é predominante. Geralmente, a primeira insaturação Δ^6 é o passo limitante e o ácido linolénico tem alta afinidade pela insaturase Δ^6 seguido por ácido linoléico e oléico (WEN e CHEN, 2003).

O alongamento da cadeia carbônica dos ácidos graxos é principalmente dependente na reação de dois sistemas de enzimas incluindo acetil-CoA enzima carboxílica e ácido graxo sintase, na maioria dos organismos. No processo de síntese dos ácidos graxos, acetil-coA é o iniciador.

Figura 6 - Biossíntese de três famílias de ácidos graxos. LA-ácido linoléico, GLA-ácido γ - linoléico, ALA- ácido alfa linoléico, AA-Ácido araquidônico, EPA- Ácido eicosapentaenóico, DPA- ácido docosapentaenóico, DHA- ácido docosahexaenóico. As siglas em negrito representam os AGE



Fonte: WEN e CHEN (2003).

O processo de alongamento da cadeia carbônica necessita da contribuição do malonil-CoA, os substratos em que a enzima atua são acetil-ACP e malonil-ACP. O tioéster de ácido graxo C16-C18 pode ser formado após várias etapas de reação. A formação de ácidos graxos de cadeia carbônica curta é semelhante nas células de plantas superiores, animais, fungos, bactérias e microalgas. Por exemplo, na célula de algas verdes, as rotas de reação do iniciador, tal como o ácido palmitoléico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico na síntese de ácidos graxos são semelhantes às reações

que ocorrem nas células de plantas e leveduras. A insaturação da cadeia carbônica de ácidos graxos ocorre a partir do C18 e o alongamento da cadeia carbônica tem lugar a produzir ácidos de cadeia longa, que não são habituais em óleos de plantas. Ácidos graxos de cadeia longa (C20-C22), geralmente estão presentes em microalgas e o teor varia de espécie para espécie. Normalmente, os ácidos graxos de cadeia curta (C14-C18) são na maioria os ácidos graxos de *Chlorella* sp., mas elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa e de hidrocarbonetos existem em algumas espécies específicas de microalgas (HUANG et al., 2010).

O EPA é o precursor dos eicosanóides em animais e humanos, os quais têm papel importante na regulação dos processos fisiológicos. Os eicosanóides são substâncias hormonais, que incluem as prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos. O AA e EPA são precursores de compostos eicosanóides. No entanto, os eicosanóides destes ácidos graxos são diferentes estruturalmente e funcionalmente, e são, algumas vezes, antagônicos em seus efeitos. Um balanço de EPA/AA pode prevenir disfunções de eicosanóides e podem ser efetivos em tratar inúmeras doenças e desordens metabólicas (GILL e VALIVETY, 1997; ALONSO e MAROTO, 2000).

Segundo Perez-Garcia et al. (2011) todos os micro-organismos usam as mesmas vias metabólicas para respiração. Como esperado, o metabolismo das microalgas é muito semelhante ao metabolismo dos vegetais superiores. No entanto, é impossível especificar substratos específicos que podem ser preferencialmente utilizados por uma espécie particular de microalga.

Durante a respiração, ao contrário da fotossíntese, oxigênio é consumido, com paralela produção de CO₂, sendo que a taxa respiratória dos substratos orgânicos está intimamente orientada para o crescimento e divisões celulares. O metabolismo respiratório em microalgas desempenha duas funções principais: serve como fonte exclusiva de energia para manutenção e biossíntese e fornece os blocos construtores de carbono para a biossíntese (GEIDER e OSBORNE, 1989).

A assimilação oxidativa da glicose começa com a fosforilação da hexose, obtendo-se glicose-6-fosfato (Figura 2), que fica disponível para o armazenamento, síntese celular e respiração. Um equivalente de uma ligação fosfato simples é necessário por mol de glicose assimilada em glicose-6-fosfato. Nesse processo, um adicional de 30

equivalentes de ligações fosfato são gerados por oxidação aeróbia de um mol de glicose (STEWART,1974).

3.2.7 BENEFÍCIOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ω 3 DE ORIGEM MICROALGAL

Os ω 3 são ácidos graxos essenciais que participam de diversas funções metabólicas. Estes ácidos representam um importante componente estrutural das membranas celulares humanas, particularmente nas células neurais. Em relação à saúde cardiovascular, o consumo regular de ácidos graxos ω 3 pode ajudar a reduzir o risco de hipertensão, trombose, enfarte do miocárdio e arritmias cardíacas. Isto ocorre porque os ácidos graxos ω 3 aumentam a razão lipoproteínas de alta densidade/lipoproteínas de baixa densidade (HDL/LDL) e diminuem a taxa colesterol total/HDL. Além dos benefícios cardiovasculares, os ácidos graxos ω 3 têm também demonstrado efeito positivo na função cerebral, do sistema nervoso e de doenças crônicas como hipertensão, diabetes, câncer e desordens autoimunes (SILVA et al., 2012). Em mulheres grávidas, a ingestão adequada de EPA e DHA é crucial para o desenvolvimento saudável do cérebro do feto. Em lactentes, o ácido araquidônico (ARA), um ácido graxo da família ω 6, e o DHA são também necessários para o crescimento normal e desenvolvimento funcional (WARD e SINGH, 2005). Interessantemente, o aumento no consumo de DHA também pode diminuir a gravidade da depressão. Efeitos imuno-modulatórios foram observados quando ácidos graxos ω 3 foram utilizados no tratamento de doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide, doença de Crohn, psoríase, lúpus, asma e fibrose cística. Crianças que ingeriam óleo de peixe mais de uma vez por semana tiveram menor probabilidade de sofrer de asma. Aumentar os níveis de DHA e EPA nos pacientes com artrite reumatóide e colite ulcerosa tem sido encontrado como uma forma de reduzir a dor e melhorar suas condições (ADARME-VEGA et al., 2012).

Atualmente, existe uma grande demanda por microalgas nas indústrias nutracêutica e farmacêutica devido a seus efeitos positivos quanto à saúde. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de origem microalgal, tais como ARA e DHA são adicionados como fortificantes em fórmulas infantis, uma indústria que vale \$10 bilhões por ano. Até o momento, os extratos de microalgas podem ser encontrados em muitos

produtos de cuidados faciais e da pele, por exemplo, em creme antienvelhecimento, produtos de regenerativos, creme solar, emoliente e calmante em esfoliantes. Dermochlorella é efetivamente extraído de *Chlorella vulgaris*, que pode estimular a síntese de colágeno na regeneração do tecido da pele e redução de rugas. Protulines é um extrato rico em proteínas de *Arthrospira (Spirulina)*, que ajuda a combater mais cedo o envelhecimento da pele, exercendo um efeito de reforço na prevenção e formação de rugas (ADARME-VEGA et al., 2012).

3.2.8 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O conteúdo e a composição dos lipídeos e ácidos graxos em microalgas podem ser influenciados por fatores como luz (FERNANDEZ et al., 2000), temperatura (RENAUD et al., 2002; COLLA et al., 2004), concentração de dióxido de carbono (ARAUJO e GARCIA, 2005), concentração da fonte de nitrogênio (COLLA et al., 2004), entre outros nutrientes.

3.2.8.1 Na presença de luz (cultivo autotrófico)

A maioria dos processos de produção de EPA investigados são baseados em crescimento fotoautotrófico (SÁNCHEZ et al., 2002; GRIMA et al., 2003). No entanto, o crescimento autotrófico pode ser limitado devido à insuficiência de luz (fotolimitação) causada pelo sombreamento das próprias células. Consequentemente, a produtividade e o rendimento do EPA de sistemas fotossintéticos são baixos (CHEN, 1996). Para aumentar a produção de EPA por culturas de microalgas, é desejável um processo de crescimento heterotrófico (WEN, 2001).

Um dos principais fatores que influenciam o conteúdo lipídico e de ácidos graxos em microalgas em termos nutricionais é a concentração de CO₂. As microalgas utilizam carbono inorgânico para o crescimento, podendo ser utilizadas na mitigação de CO₂ mais eficazmente do que vegetais superiores (BROWN e ZEILER, 1993). Sendo assim, o estudo dos efeitos da adição de CO₂ no crescimento e metabolismo de

microalgas é estimulado pela necessidade de redução da emissão deste gás na atmosfera (MURADYAN et al., 2004).

Diversos pesquisadores (Tabela 2) estudaram a produção de ácidos graxos de origem microalgal a partir de variações dos cultivos autotróficos, tais como a combinação da intensidade luminosa e concentração de CO₂ (CARVALHO e MALCATA, 2005), aumento da concentração de CO₂ (MURADYAN et al., 2004), aumento da temperatura do cultivo (COLLA et al., 2004), uso de nutrientes na forma gasosa derivados de C, N e S (RADMANN e COSTA, 2008), diferentes concentrações de CO₂ (MORAIS e COSTA, 2008) e diferentes temperatura e concentração de NO₃ (COSTA et al., 2006b).

Tabela 2 - Concentração de ácidos graxos essenciais de diversas microalgas cultivadas na presença de luz

Ácidos graxos essenciais (%)					Referência
C18:2	C18:3 (ALA)	C18:3 (GLA)	C20:5 (EPA)	C22:6 (DHA)	
<i>Pavlova lutheri</i>					CARVALHO e MALCATA (2005)
2,05	1,2	0,6	17,0	10,8	
<i>Dunaliella salina</i>					MURADYAN et al. (2004)
7,7	20,8	**	**	**	
<i>Spirulina platensis</i>					COLLA et al. (2004)
14,7	20,6	**	**	**	
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18					RADMANN e COSTA (2008)
2,71	7,61	18,1	*	*	
<i>Scenedesmus obliquus</i> LEB-22					
3,98	3,52	5,42	*	3,6	
<i>Synechococcus nidulans</i> LEB-25					
3,53	0,10	17,7	0,10	0,13	
<i>Chlorella vulgaris</i> LEB-106					
6,3	*	3,12	0,13	0,10	
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18					
2,8	1,3	9,1	9,5	**	
<i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 52					MORAIS e COSTA (2008)
10,2	6,0	15,6	2,1	**	
<i>Chlorella kessleri</i> LEB 15					
4,9	*	18,9	20,5	**	
<i>Chlorella vulgaris</i> LEB 12					
22,3	5,9	14,3	3,6	**	
<i>Chlorella vulgaris</i>					COSTA et al. (2006b)
27,1	8,5	**	**	**	
<i>Chlorella minutissima</i>					
12,45	2,2	**	**	**	

* ausência; ** não determinado

3.2.8.2 Na ausência de luz (cultivo heterotrófico)

No cultivo heterotrófico, como fonte orgânica, os açúcares são os substratos mais utilizados, especialmente a glicose (MIAO e WU, 2006; XU et al., 2006; LIANG et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2010; SHEN et al., 2010; O'GRADY e MORGAN, 2011), porém outras fontes orgânicas de carbono podem ser utilizadas tais como glicerol (LIANG et al., 2009; O'GRADY e MORGAN, 2011) e acetato (LIANG et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2010).

Segundo Martinez et al. (1991) a glicose atuando como substrato orgânico promoveu mudanças fisiológicas nas cepas de *Chlorella vulgaris* que afetaram a via metabólica de assimilação do carbono, tamanho da célula, densidade volumétrica de material de armazenamento, como grânulos de amido e lipídeos.

Pesquisadores utilizaram microalga do gênero *Chlorella*, mais especificamente *Chlorella protothecoides* em cultivo heterotrófico e avaliaram a produção de lipídeos totais e concentração de ácidos graxos (Tabela 3) quando o cultivo foi realizado com diferentes fontes de carbono: mistura de glicose e hidrolisado de amido de mandioca (WEI et al., 2009), glicose (WEI et al., 2009; O'GRADY e MORGAN, 2011) e misturas de glicerol e glicose (O'GRADY e MORGAN, 2011).

Tabela 3 - Concentração de lipídeos e ácidos graxos poli-insaturados obtidos no cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*

Fonte orgânica	Lipídeos (%)	Ácidos graxos (%)		Referência
		C18:2	C18:3	
Glicose (10 g.L ⁻¹)	34,5	39,9	9,2	
Glicose (50 g.L ⁻¹)	26,0	28,9	7,5	
Glicose (10 g.L ⁻¹) + *HAM	28,5	40,9	9,9	WEI et al. (2009)
Glicose (50 g.L ⁻¹) + *HAM	22,0	26,4	7,8	
Glicerol	31,0	4,1	**	O'GRADY e
Glicerol + Glicose	27,0	2,3	**	MORGAN
Glicose	24,0	2,1	**	(2011)

*Hidrolisado de amido de mandioca (HAM); ** não determinado.

3.2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As microalgas constituem uma fonte alternativa potencial na obtenção de ácidos graxos essenciais, sendo estes os precursores de uma grande variedade de metabólitos bioativos, que estão envolvidos em diversas funções fisiológicas no organismo humano. O consumo de ω 3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão. As microalgas marinhas são capazes de sintetizar ácidos graxos ω 3, eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6), os quais entram na cadeia alimentar marinha estando disponíveis no óleo de pescado. Estes ácidos graxos são considerados importantes no desenvolvimento do tecido cerebral e na função visual.

3.2.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-10, 2012.
- ALONSO, D.; MAROTO, F. Plant as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 481-497, 2000.
- ARAUJO, S. C.; GARCIA, V. M. T. Growth biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, p. 405-412, 2005.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, p. 9-20, 2008.
- BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v. 34, p. 1005-1013, 1993.
- CARVALHO, A. P.; MALCATA, F. X. Optimization of ω 3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 381-388, 2005.

- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 421-426, 1996.
- CHIOU, S. Y.; SU, W. W.; SU, Y. C. Optimization production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 247– 257, 2001.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 1, p. 21-34, 2004.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and Nitrogen Concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 55-59, 2004.
- COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61, p. 105-110, 2006a.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 429-436, 2006b.
- CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura – os ácidos graxos – Síntese de ácidos graxos**. São Paulo, Manole, 2002, 598p.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103-112, 2008.
- FERNANDEZ, F. G. A.; PEREZ, J. A.; SEVILLA, J. M. F.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, M. E. Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricomutum* cultures in tubular photobioreactors: Effect of dilution, tube diameter, and solar irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 173-183, 2000.

- GEIDER, R. J.; OSBORNE, B. A. Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. **New Phytologist Trust**, v. 112, p. 327-341, 1989.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 401-409, 1997.
- GURR, M. I.; JAMES, A. T.; FRAYN, K. N. **Lipid Biochemistry**. 5^a ed. Blackwell Science, 2002, 320p.
- GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6;7, p. 703-726, 2010.
- GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MEDINA, A. R.; CHISTY, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.
- GROBBELAAR, J. U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v. 70, p. 140-144, 2004.
- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978–1995, 2010.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- LEBEAU, T.; ROBERT, J. M. Diatom cultivation and biotechnology relevant products: Part II. Current and putative products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 624– 632, 2003.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.
- MARTINEZ, F.; ASCASO, C.; ORUS, M. I. Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. **Annals of Botany**, v. 67, p. 239-245, 1991.

- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217–232, 2010.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 85-93, 2004.
- MIAO, X. L.; WU, Q. Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841–846, 2006.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos Graxos de Microalgas Cultivadas com Dióxido de Carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1245-1251, 2008.
- MURADYAN, E. A.; KLYACHKO-GURVICH, G. L.; TSOGLIN, L. N.; SERGEYENKO, T. V.; PRONINA, N. A. Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 53-62, 2004.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 9^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2002, 860p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed S.A., 2011, 1273p.
- O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121–125, 2011.
- PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 7, p. 295-308, 1984.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.

- RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214, 2002.
- RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1986, 528p.
- SÁNCHEZ, M. A.; CERÓN, G. M. C.; GARCIA, C. F.; GRIMA, E. M.; CHISTY, Y. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fedbatch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 1015–1023, 2002.
- SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. Heterotrophic Culture of *Chlorella protothecoides* in Various Nitrogen Sources for Lipid Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1674–1684, 2010.
- SILVA, J. E. S.; MOURA, A. M. A.; NOGUEIRA, R. A. Efeito dos ácidos graxos essenciais sobre lipídemia e vascularização da membrana vitelina de codornas japonesas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1603-1612, 2012.
- STEWART, W. D. P. **Algal Physiology and Biochemistry**. Berkeley e Los Angeles, California, Blackwell Scientific Publications Ltd, 1974, 989p.
- TARLEY, C. R. T.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Composição em ácidos graxos de lípidos de cobertura de sardinhas (*sardinella brasiliensis*) em conserva. **Acta Scientiarum Technology**, v. 26, p. 89-95, 2004.
- WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3627–3652, 2005.
- WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S. -T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1383–1389, 2009.
- WEN, Z. Y. **A high yield and productivity strategy for eicosapentaenoic acid production by the diatom *Nitzschia laevis* in heterotrophic culture**. 2001. 116f. Thesis (Degree of Doctor of Philosophy) - University of Hong Kong, 2001, 116p.

- WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of ecosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 273 – 294, 2003.
- XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal Biotechnology**, v. 126, p. 499–507, 2006.

3.3 ARTIGO 2 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BIOMASSA DE *Chlorella* OBTIDA POR CULTIVO HETEROTRÓFICO EM FED BATCH

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

3.3.1 RESUMO

O cultivo de microalgas apresenta grande interesse devido à sua alta produtividade e rápida, velocidade de crescimento. Os ácidos graxos obtidos da biomassa microalgal podem apresentar efeitos terapêuticos em humanos e podem ser usados para produção de biodiesel. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas em modo heterotrófico. Cultivos realizados com Meio BG11 adicionado de 10g.L⁻¹ de glicose apresentaram concentração celular máxima (1,62; 1,53; 1,14 g.L⁻¹) para *Chlorella* sp., *C. homosphaera*, e *C. minutissima*, respectivamente enquanto que os ensaios sem glicose mantiveram-se com concentração celular igual à do início dos experimentos (0,15 g.L⁻¹). A microalga *C. homosphaera* cultivada em Meio BG11 e 10 g.L⁻¹ de glicose apresentou a maior concentração de lipídeos na biomassa seca (22,4 %p/p). A máxima concentração de PUFA (35,25 %p/p) e de ácidos graxos essenciais (35,05 %p/p) foi encontrada no cultivo de *C. homosphaera* em Meio Basal sem glicose, sendo esse o meio mais adequado para produção de PUFA e ácidos graxos essenciais.

PALAVRAS CHAVE: *Chloroficeae*; glicose; lipídeos; microalga.

3.3.2 ABSTRACT

The cultivation of microalgae is of great interest due to the high yields and rapid growth rates that can be produced. The fatty acids from microalgal biomass may have therapeutic effects for humans and can be used for biodiesel production. The aim of this study was to evaluate the fatty acid profile of microalgae grown in a heterotrophic

mode. Cultures that were carried out with BG11 medium supplemented with 10 g.L⁻¹ of glucose produced the highest cellular concentrations (1.62; 1.53; 1.14 g.L⁻¹) for *Chlorella* sp., *C. homosphaera* and *C. minutissima*, respectively, while the assays without glucose remained at a cellular concentration equal to that at the beginning of the experiments (0.15 g.L⁻¹). The microalga *C. homosphaera* grown in BG11 supplemented with 10 g.L⁻¹ of glucose had the highest concentration of lipids in dry biomass (22.4 %w/w). The maximum concentration of PUFA (35.25 %w/w) and essential fatty acids (35.05 %w/w) was found in *C. homosphaera* in Basal medium without glucose, which is the most suitable method for producing PUFA and essential fatty acids.

KEY WORDS: *Chloroficeae*; glucose; lipids; microalgae.

3.3.3 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas vem sendo desenvolvido, principalmente, por apresentar vantagens como a simplicidade de nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico, como os ácidos graxos (COSTA et al., 2006).

Os lipídeos das microalgas são constituídos por diferentes ácidos graxos saturados e insaturados, alguns deles da família $\omega 3$ e $\omega 6$ (HU et al., 2008; HUANG et al., 2010). O aumento da produtividade da biomassa para obtenção de ácidos graxos insaturados vem despertando interesse comercial, principalmente como fonte de $\omega 3$ (BERTOLDI et al., 2008). O consumo de $\omega 3$ é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão (KRIS-ETHERTON et al., 2002; ADARME-VEGA et al., 2012).

Os ácidos graxos nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os poli-insaturados (PUFAs) representam entre 35 e 60 % dos lipídeos totais (RICHMOND, 1986). Em relação à produção de lipídeos, as microalgas podem produzir, pelo menos, quinze vezes mais que a palma (*Elaeis guineensis*), um dos vegetais de maior rendimento e produtividade. A estimativa de produção de lipídeos

por microalgas varia de 15000 a 30000 L.km⁻² e a extração é simples, podendo ser aplicados os métodos tradicionais usados na indústria química, incluindo a extração por solventes (RADMANN e COSTA, 2008).

As principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas são no enriquecimento de rações para peixes. Podem ser também utilizados para produção de biodiesel e como fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana (MORAIS e COSTA, 2008).

O cultivo heterotrófico de microalgas faz o emprego de compostos orgânicos sem a utilização de luz, em que o carbono orgânico é utilizado como fonte energética para a produção de biomassa (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004). Como fonte orgânica, os açúcares são os substratos mais utilizados, especialmente a glicose (XU et al., 2006; MIAO e WU 2006; LIANG et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2010; SHEN et al., 2010; O'GRADY e MORGAN, 2011), porém outras fontes orgânicas de carbono podem ser utilizadas tais como glicerol (LIANG et al., 2009; O'GRADY e MORGAN, 2011) e acetato (LIANG et al., 2009; HEREDIA-ARROYO et al., 2010). Este tipo de cultivo oferece vantagens sobre o autotrófico como a eliminação da variação da fonte natural de luz, mantendo-se o controle do processo de cultivo e baixo custo para recuperação da biomassa (HUANG et al., 2010; XU et al., 2006; MIAO e WU, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima* cultivadas de modo heterotrófico.

3.3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.4.1 Micro-organismos e meios de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima* (COSTA et al., 2006), todas pertencentes à Coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Biorquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Todas as microalgas foram mantidas e cultivadas em Meio BG11 (RIPPKA et al., 1979) contendo (g.L⁻¹): NaNO₃ (1,50); K₂HPO₄.3H₂O (0,04);

MgSO₄·7H₂O (0,075); CaCl₂·2H₂O (0,036); C₆H₁₁FeNO₇ (0,006); EDTA dissódico (0,001); Na₂CO₃ (0,02); C₆H₈O₇ (0,006); H₃BO₃ (2,86); MnCl₂·4H₂O (1,81); ZnSO₄·7H₂O (0,222); Na₂MoO₄·2H₂O (0,39); CuSO₄·5H₂O (0,079); Co(NO₃)₂·6H₂O (0,0494); e em Meio Basal (XIONG et al., 2008) contendo (g.L⁻¹): KH₂PO₄ (0,7); K₂HPO₄ (0,3); MgSO₄·7H₂O (0,3); FeSO₄·7H₂O (0,003); glicina (0,1); vitamina B1 (0,00001) e 1 mL.L⁻¹ de solução mineral A5.

3.3.4.2 Condições de cultivo

Antes do início dos experimentos, o inóculo das microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima* foi colocado em estufa termostaticada a 30 °C com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, iluminância de 2500 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia e circulação de ar estéril, para aumentar a concentração celular. Posteriormente, foi realizado acompanhamento das microalgas em microscópio a fim de constatar se havia somente a microalga de interesse para os cultivos. Logo a seguir, as microalgas foram adaptadas à condição dos experimentos. O término da adaptação foi considerado o momento em que as microalgas consumiram totalmente a glicose, o que variou conforme concentração da fonte de carbono. A adaptação dos ensaios realizados com 5 g.L⁻¹ de glicose terminou dentro de 1 dia, já a do ensaio com 10 g.L⁻¹ foi de 2 dias.

Os cultivos foram realizados em modo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono. Os Meios BG11 e Basal foram complementados com 0; 5 e 10 g.L⁻¹ de glicose. Foram realizados 3 ensaios em duplicata para cada microalga nos dois meios de cultivo, totalizando 36 ensaios. A adição de glicose aos cultivos foi realizada diariamente em modo batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total (5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹) (XU et al., 2006) de glicose durante 10 dias de experimento (XIONG et al., 2008). Os cultivos foram realizados em agitador orbital (INNOVA®44, USA) a 150 rpm e 30 °C utilizando biorreatores fechados de 2 L com volume útil de 1,6 L (*C. homosphaera* e *C. minutissima*) e 1,4 L (*Chlorella* sp.). O volume dos ensaios realizados com a microalga *Chlorella* sp. foi menor que os demais devido a menor concentração celular do inóculo. A concentração inicial da biomassa foi 0,15 g.L⁻¹. Ao

final dos 10 dias, os cultivos foram centrifugados e a biomassa foi seca em estufa a 40 °C por 60 h e moídas.

3.3.4.3 Determinações analíticas

A amostragem dos cultivos foi realizada a cada 24 h. Amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, obtida por meio da análise densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro (Femto Plus 700, Brasil) com auxílio de curva de calibração pré-determinada.

Foram avaliadas a concentração máxima de biomassa (X_{\max} , g.L⁻¹), a produtividade máxima (P_{\max} , g.L⁻¹.d⁻¹) obtida segundo a equação $P = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, onde X_t é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t (d), e X_0 a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t_0 (d) (SCHMIDELL et al., 2001) e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max} , d⁻¹), obtida por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento logarítmica (BAILEY e OLLIS, 1986).

A concentração de glicose foi determinada no meio de cultivo a cada 48 h utilizando kit enzimático colorimétrico Glicose PAP Liquiform (Labtest, Brasil), com leitura em absorvância a 505 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração.

O pH das culturas foi determinado diariamente em pHmetro digital (Quimis Q400HM, Brasil).

3.3.4.4 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídeos totais foi utilizada a metodologia proposta por Folch et al. (1957) com etapa prévia de rompimento da parede celular por meio de banho ultrassônico. A fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia adaptada de Metcalfé et al. (1966).

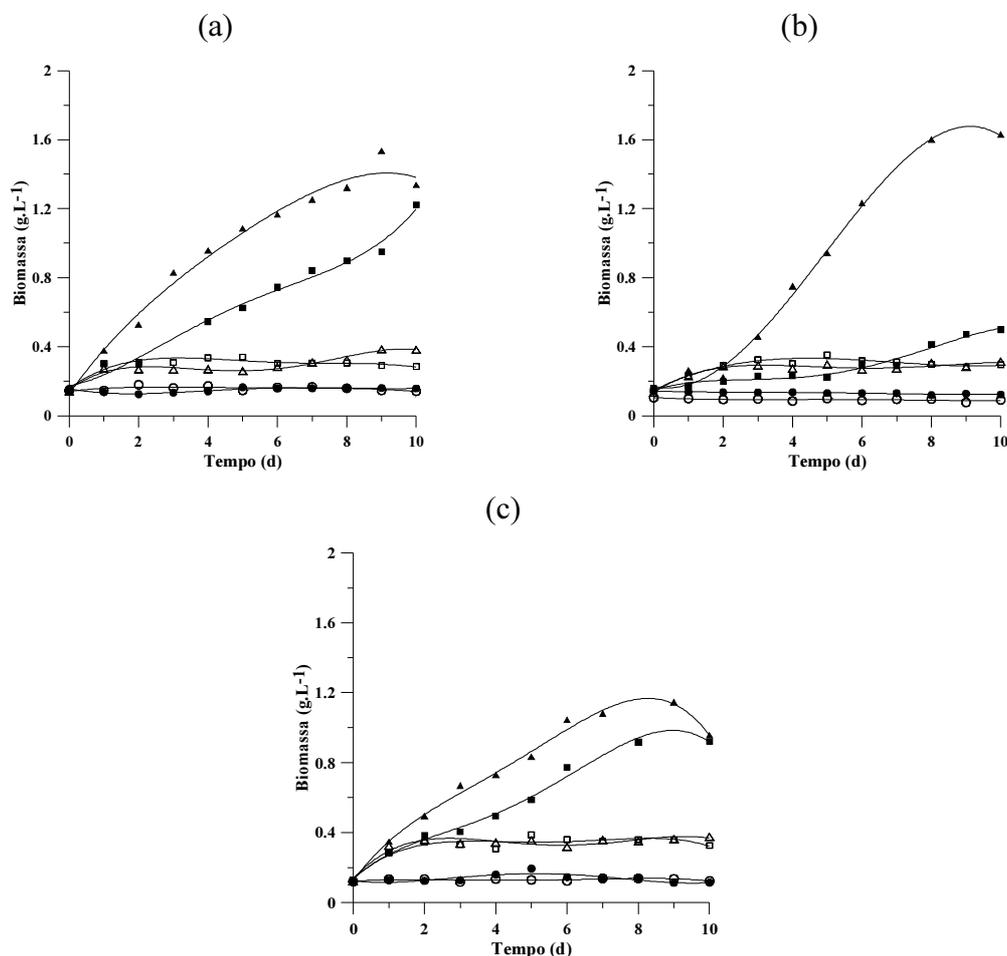
A determinação de ácidos graxos foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Varian 3400CX, equipado com detector de ionização de chama e coluna ZB-WAX com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme. O gás de arraste foi hidrogênio a 0,5 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram

250 e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 40 °C aumentando 6 °C.min⁻¹ até 100 °C permanecendo 1 min após a 160 °C permanecendo 5 min e a 230 °C permanecendo 10 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas. Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Belle-fonte, EUA) foram ácido butírico (C4:0), ácido caprótico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido undecanóico (C11:0), ácido láurico (C12:0), ácido tridecanóico (C13:0), ácido mirístico (C14:0), ácido miristoléico (C14:1), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido *cis*-10-pentadecenóico (C15:1), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido *cis*-10-heptadecenóico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1n9), ácido linoléico (C18:2n6), ácido alfa-linolénico (C18:3n3), ácido γ -linolénico (C18:3n6), ácido araquídico (C20:0), ácido *cis*-11-eicosenóico (C20:1n9), ácido *cis*-11,14-eicosadienóico (C20:2), ácido *cis*-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3), ácido *cis*-8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6), ácido araquidônico (C20:4n6), ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5n3), ácido henicosanóico (C21:0), ácido beénico (C22:0), ácido erúico (C22:1n9), ácido *cis*-13,16-docosadienóico (C22:2), ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3), ácido tricosanóico (C23:0), ácido lignocérico (C24:0), ácido nervônico (C24:1n9).

3.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento dos cultivos heterotróficos das microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima*. Os cultivos complementados com glicose apresentaram aumento da concentração celular ao longo de 10 dias de cultivo.

Figura 1 - Curvas de crescimento das microalgas cultivadas nos Meios BG11 e Basal:
 (a) *Chlorella homosphaera* (b) *Chlorella* sp. (c) *Chlorella minutissima*. (●) BG11 + 0 g.L⁻¹ glicose; (■) BG11 + 5 g.L⁻¹ glicose; (▲) BG11 + 10 g.L⁻¹ glicose; (○) Basal + 0 g.L⁻¹ glicose; (□) Basal + 5 g.L⁻¹ glicose; (△) Basal + 10 g.L⁻¹ glicose



As microalgas *Chlorella homosphaera* e *Chlorella minutissima* apresentaram fase estacionária após 6 dias, quando cultivadas em Meio BG11 complementado com 10 g.L⁻¹ de glicose. A Figura 1 mostra que as três microalgas apresentaram maior crescimento logarítmico quando cultivadas com BG11 adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose em comparação aos demais ensaios. As Figuras 1a e 1c mostram que as microalgas *Chlorella homosphaera* e *Chlorella minutissima* apresentaram fase exponencial do 1º ao 6º dia. No entanto, a produção de biomassa foi menor quando os cultivos foram realizados com BG11 adicionado de 5 g.L⁻¹, indicando a importância da glicose no cultivo heterotrófico, para produção de biomassa.

A maior produção de biomassa ocorreu quando as microalgas foram cultivadas com maior concentração de glicose (10 g.L^{-1}). Como no cultivo heterotrófico é necessário maior aporte nutricional para a microalga manter suas funções fisiológicas e aumentar a concentração celular, a fonte orgânica de carbono, neste caso a glicose, torna-se necessária em maiores concentrações.

A Tabela 1 apresenta os valores de concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L^{-1}), produtividade diária máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}), concentrações de lipídeos (%p/p), PUFA (%p/p) e $\omega 6 + \omega 3$ (%p/p) para os ensaios realizados com as três espécies de *Chlorella*.

A microalga *C. homosphaera* atingiu concentração celular de $1,53 \text{ g.L}^{-1}$ em 10 dias quando cultivada de modo heterotrófico com Meio BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} de glicose. Quando cultivada com adição de 5 g.L^{-1} de glicose no meio, *C. homosphaera* alcançou $1,22 \text{ g.L}^{-1}$. Resultados inferiores foram encontrados por Liang et al. (2009) quando cultivaram *C. vulgaris* no escuro com 1 % de glicose, em que obtiveram concentração celular máxima de $1,20 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade máxima de $0,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. No entanto, valores superiores foram encontrados por Xu et al. (2006) para a microalga *Chlorella protothecoides*, observando crescimento celular de $3,92 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,74 \text{ g.L}^{-1}$ em 6 dias de cultivo quando utilizaram hidrolisado de milho e glicose, respectivamente como fonte de carbono. Ambos cultivos foram realizados com Meio Basal e limitação da fonte de nitrogênio (glicina). Liu et al. (2011) cultivaram *Chlorella zofingiensis* de modo autotrófico e heterotrófico observando melhores resultados ($\mu = 0,769 \text{ d}^{-1}$ e $X_{\text{máx}} = 9,7 \text{ g.L}^{-1}$) para o cultivo heterotrófico.

Algumas espécies de *Chlorella* tem a capacidade de crescer em ambiente autotrófico e heterotrófico. Estudos realizados por Xu et al. (2006) e Liu et al. (2011) comprovaram que esse gênero de microalga, apresenta maiores rendimentos quando cultivado de modo heterotrófico utilizando fonte de carbono exógena, como por exemplo a glicose. Comparando-se os resultados obtidos por esses autores e do estudo em questão nota-se diferença no crescimento celular máximo atingido pelas microalgas. Estes dados mostram que apesar das microalgas do gênero *Chlorella* crescerem bem na ausência de luz, diferenças são observadas quanto à espécie estudada.

A máxima concentração celular ($X_{\text{máx}}$, Tabela 1) para as três microalgas estudadas foi obtida com 3 Meio BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} de glicose. No entanto, o

mesmo não é observado quanto a produção de lipídeos, PUFA e ácidos graxos essenciais $\omega 6 + \omega 3$, nos quais os valores máximos variaram de acordo com a espécie de microalga. Em função disso, a produção em concentrações diferenciadas dos biotivos, pelas microalgas, pode estar associada ao metabolismo da fonte de carbono de cada espécie. Segundo Narang e Pilyugin (2005), a concentração de glicose requerida para um crescimento metabólico ótimo pode estar relacionado a combinação de fatores específicos como a espécie microalgal como fator primário e as condições ambientais e de cultivo como fator secundário. Conseqüentemente, cada combinação de fatores pode conduzir a diferentes níveis de consumo e produção de bioprodutos.

As máximas produtividades para as três microalgas foram obtidas nos ensaios realizados com Meio BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} de glicose, o que indica um crescimento mais rápido no mesmo intervalo de tempo quando comparado aos outros ensaios realizados nas demais condições de cultivo. Isto provavelmente ocorreu devido aos diferentes nutrientes presentes no meio de cultivo e maior concentração de carbono orgânico.

As máximas velocidades específicas de crescimento obtidas foram $0,59 \text{ l.d}^{-1}$ e $0,35 \text{ l.d}^{-1}$ para as microalgas *Chlorella homosphaera* e *Chlorella* sp. respectivamente, ambas cultivadas com BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} de glicose. Não foram considerados os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para os cultivos realizados com Meio BG11 sem adição de glicose e com Meio Basal por não haver uma fase exponencial de crescimento celular.

A maior concentração de lipídeos (22,4 %p/p) foi obtida no ensaio realizado com a microalga *C. homosphaera* cultivada em meio BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} de glicose. Resultados inferiores foram encontrados por Costa et al. 2006, onde *C. minutissima* obteve 7,98 %p/p quando cultivada a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 2500 lux, NaHCO_3 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ NO_3 . Porém, resultados superiores foram obtidos por Xu et al. (2006), nos quais acumularam nas células de *Chlorella protothecoides* 55,2 %p/p e 54,7 %p/p de lipídeos em cultivo heterotrófico utilizando hidrolisado de milho e glicose, respectivamente como fonte de carbono.

Tabela 1 - Concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L^{-1}), produtividade diária máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}), concentrações de lipídeos (%p/p), PUFA (%p/p) e $\omega 6+\omega 3$ (%p/p) para os ensaios realizados com as três espécies de *Chlorella*

Meio	Glicose (g.L^{-1})	$X_{\text{máx}}$ (g.L^{-1})	$P_{\text{máx}}$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	Lipídeos (%p/p)	PUFA (%p/p)	$\omega 6+\omega 3$ (%p/p)
<i>Chlorella homosphaera</i>							
BG11	0	0,15	0,03	-	15,0±0,00	6,1±0,00	4,6±0,00
	5	1,22	0,30	0,23	11,1±0,64	18,6±0,85	19,1±1,06
	10	1,53	0,32	0,59	22,4±0,00	20,2±2,55	19,5±0,00
Basal	0	0,15	0,03	-	19,3±3,96	35,25±1,06	35,05±1,06
	5	0,34	0,16	-	13,8±1,20	20,45±9,97	19,85±9,69
	10	0,39	0,13	-	16,5±4,95	24,75±2,05	24,3±1,84
<i>Chlorella</i> sp.							
BG11	0	0,15	0,01	-	11,4±0,00	10,6±0,99	10,0±0,71
	5	0,50	0,29	0,08	9,0±0,14	3,6±1,13	3,45±1,06
	10	1,62	0,38	0,35	12,9±0,00	15,75±0,64	15,35±0,92
Basal	0	0,15	0,02	-	7,2±0,00	24,35±0,21	24,05±0,21
	5	0,35	0,09	-	21,0±0,00	18,2±0,00	17,75±0,00
	10	0,31	0,10	-	11,9±2,55	19,5±1,13	19,4±0,99
<i>Chlorella minutissima</i>							
BG11	0	0,15	0,04	0,00	14,4±0,00	16,8±0,00	16,1±0,00
	5	0,92	0,19	0,18	8,4±0,42	21,45±1,06	21,0±1,13
	10	1,14	0,26	0,22	8,7±0,71	18,55±1,34	17,95±0,92
Basal	0	0,15	0,03	0,00	15,3±2,47	19,6±0,14	18,9±0,28
	5	0,39	0,16	-	17,1±0,00	21,7±0,00	21,4±0,00
	10	0,38	0,20	-	21,5±1,13	25,65±8,84	24,95±7,99

Na Tabela 1, as maiores concentrações de PUFA (35,25 %p/p) e ácidos graxos essenciais (35,05 %p/p) são obtidas pela microalga *C. homosphaera*, no entanto quando cultivada com Meio Basal sem adição de glicose. Radmann e Costa (2008) cultivaram *C. vulgaris* em 12 %p/p CO₂, 60 µL.L⁻¹ SO₂, 100 µL.L⁻¹ a 30 °C obtiveram 10,1 %p/p de ácidos graxos poli-insaturados (ω3+ω6).

Nos cultivos realizados com Meio Basal, as microalgas produziram menos biomassa, porém a biomassa obtida continha maior concentração de PUFA e ácidos graxos essenciais quando comparado aos cultivos realizado com Meio BG11 (Tabela 1). Isto indica que a microalga *Chlorella* suporta a deficiência de nitrogênio podendo alterar sua rota metabólica, diminuindo a síntese protéica e consequentemente, aumentando a síntese lipídica. Estes resultados vão ao encontro com os de Illman et al. (2000), Macedo e Alegre (2001), Zhila et al. (2005), Xiong et al. (2008), Hu et al. (2008), Griffiths e Harrison (2009), Liang et al. (2009), Widjaja et al. (2009) e Shen et al. (2010) nos quais mostram que altas concentrações de nitrogênio resultam em maiores concentrações de biomassa, enquanto que maiores teores de lipídeos são obtidos em menores concentrações de nitrogênio. Wei et al. (2009) observaram no cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella protothecoides* que a menor concentração de glicose adicionada foi acompanhada pelo maior conteúdo de lipídeos. A adição de 10 g.L⁻¹ de glicose, resultou em 34,5 %p/p de lipídeos. Além disso, quando o micro-organismo cessa a multiplicação celular e entra na fase estacionária, o metabolismo de lipídeos é mais acentuado. Sendo assim, é possível justificar que a síntese de biomoléculas, neste caso de lipídeos, pela microalga, inicia quando cessa a produção de biomassa.

As microalgas são micro-organismos fotoautotróficos e quando submetidos à condição de estresse (por exemplo, ausência de luz e restrição de algum nutriente) são estimulados a produzirem maiores concentrações de um metabólito específico. A ausência de luz e limitação de nitrogênio no meio de cultivo causam estresse celular e, além disso quando encontram-se na fase estacionária de crescimento celular, desviam o metabolismo para produção de lipídeos. Então, a maior concentração de PUFA e ácidos graxos essenciais observada nos cultivos realizados com o meio de cultura Basal podem ser justificados pela baixa concentração de glicina (C₂H₅O₂N=0,1 g.L⁻¹) disponível no meio.

Perez-Garcia et al. (2011) citam que no cultivo heterotrófico de microalgas, a assimilação oxidativa da glicose começa com a fosforilação da hexose, obtendo-se glicose-6-fosfato, na qual fica prontamente disponível para o armazenamento, síntese celular e respiração. As vias utilizadas pelos micro-organismos para a degradação da glicose são via glicolítica – EMP e via da pentose fosfato - PPP, nos quais ocorrem em microalgas. Hong e Lee (2007) relatam que provavelmente a maior diferença no metabolismo da glicose em crescimento heterotrófico de microalgas, comparando com o metabolismo autotrófico da glicose ou outros substratos orgânicos que não carboidratos, é que em condições escuras, a glicose é principalmente metabolizada pela PPP, enquanto que a EMP é a forma preferida pelas células quando em condições de iluminação. Ambas vias ocorrem no citosol e são funcionais em células de microalgas.

O ácido palmítico (C16:0), o precursor dos ácidos graxos saturados e insaturados (Nelson e Cox, 2011), variou de 15,8 a 29,6 %p/p nos diferentes ensaios, sendo observado que este ácido graxo saturado aparece em maiores concentrações nos ensaios realizados com adição de glicose (Tabela 2). Radmann e Costa, 2008 no cultivo da microalga *C. vulgaris* obtiveram 4,6 %p/p de ácido palmítico e Costa et al., 2006 no cultivo da microalga *C. minutissima* obtiveram valores variando de 4,55 a 21,68 %p/p deste mesmo ácido graxo, enquanto Wei et al. 2009 em cultivo heterotrófico da microalga *C. protothecoides* encontraram valores de 19,44 a 27,27 %p/p. Este ácido graxo saturado é muito importante para a alimentação infantil sendo encontrado no leite materno nas concentrações de 20 a 30 %p/p (Willis et al., 1998). Além disso, sabe-se que os ácidos graxos saturados são responsáveis pela produção de energia; porém, a organização molecular do ácido palmítico é fundamental para maximizar a absorção de cálcio (AGOSTINI, 2003).

A variação do meio de cultivo, concentração de glicose e cepa influenciaram na produção do ácido palmitoléico (C16:1), que apareceu em maior concentração (26,4 %p/p) no cultivo de *Chlorella* sp. (BG11 sem adição de glicose). Este ácido graxo é um importante constituinte da dieta humana, uma vez que auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares (WILLIS et al., 1998), equilíbrio dos níveis de colesterol HDL e LDL, redução da taxa de açúcar no sangue, além de favorecer a queda de gordura dos tecidos que envolvem o fígado e o coração (WEN e CHEN, 2000).

Neste estudo, o ácido graxo oléico (C18:1n9) apresentou maior concentração (35,1 %p/p) no ensaio com *Chlorella* sp. (Basal adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose). Isleten-Hosoglu et al. (2012) reportaram composição similar deste ácido graxo, atingindo 32,2 %p/p no cultivo heterotrófico de *Chlorella saccharophila*, enquanto que Wang et al. (2012) obtiveram concentração máxima de 20,96 %p/p quando cultivaram de modo heterotrófico a microalga *Chlorella kessleri*.

Os ácidos graxos da família ω3: α-linolénico (C18:3), EPA (C20:5) e DHA (C22:6) e da família ω6: linoléico (C18:2), γ-linolénico (C18:3) e araquidônico (C20:4) são considerados essenciais, uma vez que o metabolismo humano não é capaz de sintetizá-los e por isso devem ser adicionados à dieta, contribuindo na prevenção de uma série de doenças. Ao contrário dos humanos, as microalgas são capazes de sintetizar estes ácidos graxos, principalmente em cultivo heterotrófico. De acordo com Adarme-Vega et al. (2012) microalgas heterotróficas são excelentes fontes alternativas de DHA, em especial para ser adicionado ao leite em pó infantil.

A maior concentração dos ácidos graxos essenciais linoléico (C18:2n6) (33,9 %p/p), γ-linolénico (C18:3n6) (8,2 %p/p) e α-linolénico (C18:3n3) (2,3 %p/p) foi obtida nos cultivos das microalgas *C. homosphaera* (Basal sem adição de glicose), *C. homosphaera* (Basal adicionado de 5 g.L⁻¹ de glicose) e *C. minutissima* (Basal adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose), respectivamente. O'Grady e Morgan (2011), Radmann e Costa (2008) e Costa et al. (2006) cultivaram cepas de *Chlorella* sob diferentes condições e encontraram valores máximos de 4,1 %p/p; 3,12 %p/p e 2,1 %p/p para os ácidos graxos linoléico, γ-linolénico e α-linolénico, respectivamente.

O ácido araquidônico (C20:4n6) apareceu em maior concentração (1,5 %p/p) no ensaio *C. minutissima* BG11 sem adição de glicose. Radmann e Costa (2008) cultivando *C. vulgaris* obtiveram concentração máxima de 0,49 %p/p de C20:4n6. Este ácido graxo essencial da família ω6 é requerido por lactentes para seu crescimento normal e desenvolvimento funcional (ADARME-VEGA et al., 2012).

O ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa, ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5n3) (EPA, C20:5n3) aparece em maiores concentrações nos seguintes ensaios: *C. homosphaera* cultivada em BG11 sem adição de glicose, *C. homosphaera* cultivada em BG11 adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose e *Chlorella* sp.

cultivada em BG11 sem adição de glicose. Suas concentrações correspondem a 1,1; 1,1 e 0,8 %p/p, respectivamente.

Outro ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa, ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3) (DHA, C22:6n3) aparece em maiores concentrações (2,0 e 1,1 %p/p) nos ensaios com a microalga *C. homosphaera* cultivada em Basal adicionado de 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ de glicose, respectivamente.

Estes ácidos graxos da família ω 3, além de prevenir doenças cardiovasculares devido ao aumento da relação HDL/LDL, também apresentam benefícios para as funções cerebrais e sistema nervoso. Em mulheres grávidas, a ingestão adequada de EPA e DHA é crucial para o desenvolvimento saudável do cérebro (ADARME-VEGA et al., 2012) e da visão do feto, sendo portanto os PUFAs incluídos em uma variedade de alimentos para bebês (ABAD e TURON, 2012).

Tabela 2 - Perfil cromatográfico (%p/p) das microalgas cultivadas sob diferentes condições

AG	<i>Chlorella homosphaera</i>						<i>Chlorella</i> sp.						<i>Chlorella minutissima</i>					
	BG11		Basal				BG11		Basal				BG11		Basal			
			Glicose (g.L ⁻¹)						Glicose (g.L ⁻¹)						Glicose (g.L ⁻¹)			
	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10
C12:0	4,1	2,5	4,9	1,9	19,4	1,6	0,2	6,9	4,5	4,9	3,5	2,6	*	3,5	3,5	*	3,6	*
C14:0	1,3	1,6	1,0	0,7	4,8	0,5	1,6	1,0	1,6	1,4	0,7	0,7	0,9	1,1	0,5	1,1	0,6	0,2
C14:1	1,0	0,9	0,9	0,2	4,0	0,3	0,3	0,6	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	1,3	0,7	1,2	0,5
C15:0	1,3	1,7	1,1	0,6	1,2	0,3	0,3	1,2	0,9	1,8	0,7	0,3	5,7	1,5	1,7	1,6	0,5	1,9
C15:1	0,3	0,8	0,8	0,2	0,2	0,1	2,4	0,5	1,3	3,1	0,5	0,6	2,3	1,1	0,3	0,9	0,3	2,7
C16:0	22,1	23,6	23,7	15,8	28,2	26,2	18,1	20,3	19,6	14,5	19,1	20,8	17,3	21,6	22,6	16,7	29,6	21,9
C16:1	15,1	8,1	8,5	11,9	3,7	6,4	26,4	11,9	13,8	16,1	7,5	4,9	14,2	8,6	6,4	18,4	5,9	3,1
C17:0	2,7	1,6	*	4,9	0,4	1,7	0,3	0,9	5,4	9,5	*	*	*	*	0,3	*	0,3	*
C17:1	*	*	*	0,3	*	0,5	0,6	12,6	7,2	0,4	*	*	*	*	*	*	*	*
C18:0	9,4	2,4	2,4	3,9	7,9	0,8	3,4	2,7	2,2	1,1	4,1	3,1	0,9	2,9	5,5	0,7	0,7	1,2
C18:1n9	28,7	22,4	22,3	10,4	7,3	30,0	33,9	32,1	19,9	10,5	29,9	35,1	9,0	22,1	33,7	7,0	27,1	24,2
C18:2n6	1,5	16,9	16,8	33,9	8,0	19,8	6,4	2,1	14,6	23,6	16,9	18,9	8,6	15,5	14,3	13,8	20,8	18,5
C20:0	7,1	14,6	11,4	13,7	0,9	6,4	1,0	3,7	6,3	12,3	12,9	10,1	30,8	13,0	4,8	32,7	6,8	17,3
C18:3n6	0,6	0,4	0,5	0,8	8,2	0,4	0,5	0,4	0,2	0,5	0,3	0,3	5,4	2,3	1,4	3,3	0,2	2,9
C18:3n3	0,6	0,3	0,6	0,1	0,8	2,2	2,0	0,5	0,2	*	0,2	0,3	0,2	*	0,3	0,2	0,2	2,3
C20:1n9	0,2	0,6	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,6	0,2	*	0,2	0,5	0,4	0,1	0,6	0,4
C20:5	0,5	*	0,3	*	0,4	0,2	*	*	0,5	0,6	0,4	0,2	*	*	0,4	0,6	0,4	0,4
C20:3n6	0,3	*	*	*	0,2	0,4	0,1	0,2	*	*	*	*	*	*	0,2	0,2	*	0,5
C20:3n3	*	*	*	*	0,4	0,1	*	*	*	*	*	*	*	1,6	1,0	0,2	*	0,2
C20:4n6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,3	0,2	0,1	0,1	*	0,1	*	1,5	0,6	1,0	1,0	0,2	0,3
C22:2	1,0	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5	0,2	0,2	*	0,5	*	0,6	0,4	0,5	0,2	*	0,7
C20:5n3	1,1	0,4	1,1	0,2	0,3	0,2	0,8	0,2	*	*	0,5	0,5	*	*	0,3	0,2	*	0,2
C24:0	0,3	0,2	1,3	0,2	0,6	0,3	0,8	1,0	2,7	0,7	1,5	1,2	1,0	1,6	0,7	0,4	0,4	0,6
C24:1n9	0,3	0,6	0,4	0,2	0,6	0,3	0,5	0,7	1,6	0,5	0,9	0,7	0,2	0,6	0,2	0,4	0,7	0,5
C22:6n3	0,4	0,3	0,3	0,1	2	1,1	0,6	0,2	0,6	*	0,1	*	0,2	0,8	0,7	0,4	*	0,3

AG: Ácidos graxos; n3: ácido graxo ω3; n6: ácido graxo ω6; n9: ácido graxo ω9; *: não detectado.

3.3.6 CONCLUSÃO

O Meio BG11 utilizado no cultivo das microalgas do gênero *Chlorella* favoreceu a produção de biomassa, enquanto que o Meio Basal foi eficiente na obtenção de PUFA's e ácidos graxos essenciais. A concentração celular máxima obtida foi 1,62 g.L⁻¹ para a microalga *Chlorella* sp. em Meio BG11 adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose. O maior conteúdo lipídico (22,4 %p/p) foi obtido no cultivo da microalga *C. homosphaera* com Meio BG11 adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose. As maiores concentrações de PUFA (35,25 %p/p) e ácidos graxos essenciais $\omega_6+\omega_3$ (35,05 %p/p) também foram obtidos pela mesma microalga (*C. homosphaera*), porém quando cultivada em Meio Basal sem adição de glicose.

O perfil de ácidos graxos mostrou o ácido oléico (C18:1n9) como o mais abundante (35,1 %p/p) na biomassa de *Chlorella* sp. em Meio Basal adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose. No entanto, o ácido graxo saturado que apareceu em maior concentração (32,7 %p/p) foi o ácido araquídico (C20:0) no cultivo de *C. minutissima* em meio Basal sem adição de glicose.

O cultivo heterotrófico de *Chlorella* é eficaz na produção de ácidos graxos poli-insaturados, em especial os ácidos graxos essenciais. Estes podem ser utilizados para a alimentação, já que o metabolismo humano não é capaz de sintetizá-los. Sendo assim, o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* é mais indicado quando se deseja obter benefícios à saúde tal como prevenção e atenuação de problemas cardíacos, doenças crônicas e controle do colesterol.

3.3.7 AGRADECIMENTOS

A CAPES/Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos e ao CNPq – Rede Nanofotobiotec III, pelo apoio financeiro.

3.3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733-741, 2012.
- ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-10, 2012.
- AGOSTONI, C. Compliance of present recommendations of fatty acids in formulas for term infants with the actual human milk fatty acid composition in different populations, **Acta Paediatrica**, v. 92, p. 785-789, 2003.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2^a ed, Singapore: McGraw-Hill, 1986, 984p.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, p. 9-20, 2008.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 1, p. 21-34, 2004.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung - A Journal of Chemical Sciences**, v. 59, p. 55-59, 2004.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 429-436, 2006.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 493–507, 2009.
- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978–1995, 2010.
- HONG, S. -J.; LEE, C. -G. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 165-173, 2007.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GUIRARD, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances, **The Plant Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology, **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631–635, 2000.
- ISLETEN-HOSOGLU, M.; GULTEPE, I.; ELIBOL, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 11-19, 2012.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease, **Circulation**, v. 106, p. 2747-2757, 2002.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.
- LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 106-110, 2011.

- MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do Teor de Nitrogênio no Cultivo de *Spirulina Maxima* em Dois Níveis de Temperatura – Parte II. Produção de Lipídeos. **Ciência e Tecnol de Alimentos**, v. 21, p. 183–186, 2001.
- METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.
- MIAO, X. L.; WU, Q. Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841–846, 2006.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1245-1251, 2008.
- NARANG, A.; PILYUGIN, S. S. Towards an integrated physiological theory of microbial growth: from subcellular variables to population dynamics. **Mathematical Biosciences and Engineering**, v. 2, p. 173-210, 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed S.A., 2011, 1273p.
- O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 34: 121–125, 2011.
- PEREZ-GARCIA, R. O.; BASHAN, Y.; PUENTE M. E. Organic carbon supplementation of municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and ammonium removing by the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190–199, 2011.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1986, 528p.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G.; Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**, vol. 2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001, 541p.

- SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. Heterotrophic Culture of *Chlorella protothecoides* in Various Nitrogen Sources for Lipid Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1674–1684, 2010.
- WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 402-409, 2012.
- WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S. -T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p.1383–1389, 2009.
- WEN, Z. Y.; CHEN, F. Production potencial of eicosapentainoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 218-224, 2000.
- WIDJAJA, A.; CHIEN, C. -C.; JU, Y. -H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 13–20, 2009.
- WILLIS, W. M.; LENCKI, R. E.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Criticals Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 639-674, 1998.
- XIONG, W.; Li, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 78, p. 29–36, 2008.
- XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.126, p. 499–507, 2006.
- ZHILA, N. O.; KALACHEVA, G. S.; VOLAVA, T. G. Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, p. 357–65, 2005.

3.4 ARTIGO 3 - CONTEÚDO LIPÍDICO DA BIOMASSA DE *Chlorella homosphaera* CULTIVADA DE MODO HETEROTRÓFICO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBONO E NITROGÊNIO

¹*Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.*

3.4.1 RESUMO

O crescente interesse no estudo do cultivo de microalgas tem sido realizado visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos bioativos e medicinais com alto valor no mercado mundial. Estes são empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da concentração das fontes de carbono (glicose, $C_6H_{12}O_6$) e nitrogênio ($NaNO_3$) no crescimento heterotrófico e na produtividade lipídica da microalga *Chlorella homosphaera*. O planejamento fatorial completo utilizado foi do tipo 2^2 com três repetições no ponto central. Os fatores de estudo foram as concentrações de glicose (5, 10 e 15 $g.L^{-1}$) e de $NaNO_3$ (0,5; 1,0 e 1,5 $g.L^{-1}$) e as respostas analisadas foram as concentrações de lipídeos totais e de biomassa, totalizando sete experimentos. O cultivo realizado com 5 $g.L^{-1}$ de glicose e 1,5 $g.L^{-1}$ de $NaNO_3$ foi o que apresentou maior produção de biomassa (1,22 $g.L^{-1}$) e maior produtividade lipídica (13,07 $mg.L^{-1}.d^{-1}$), com predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0 - 23,6 %p/p) e linoléico (C18:1n9 - 22,4 %p/p).

PALAVRAS CHAVE: Glicose, microalga, $NaNO_3$.

3.4.2 ABSTRACT

The increased interest in microalgae cultivation study have been conducted aimed biomass producing for use in food preparation, bioactive compounds obtaining

medicinal high value on the world market and can be especially used in functional foods development, for their nutritional and pharmaceutical properties. The aim of this study was to evaluate the influence of the concentration of the carbon source (glucose) and nitrogen source (NaNO_3) in heterotrophic growth and lipid productivity of microalga *Chlorella homosphaera*. A 2^2 full factorial experimental design was made with three replicates at the center point, using factors glucose (5, 10 and 15 g.L^{-1}) and NaNO_3 (0.5, 1.0 and 1.5 g.L^{-1}) concentrations, and total lipid and biomass concentrations as solutions, totaling 7 experiments. The cultivation performed with 5 g.L^{-1} of glucose and 1.5 g.L^{-1} of NaNO_3 showed the highest biomass yield (1.22 g.L^{-1}) and higher lipid productivity ($13.07 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), predominantly palmitic fatty acid (C16:0 - 23.6 %w/w) and linoleic acid (C18:1n9 - 22.4 %w/w).

KEY WORDS: Glucose, microalga, NaNO_3 .

3.4.3 INTRODUÇÃO

O acúmulo de lipídeos pelas microalgas a fim de fornecer recursos alternativos na obtenção de matéria oleosa é uma área de pesquisa que está chamando atenção para produção de biodiesel, bem como para obtenção de ácidos graxos poli-insaturados para nutrição humana, devido à sua alta eficiência de produção e menor demanda de terras agrícolas (HEREDIA-ARROYO et al., 2010).

Nas microalgas, o armazenamento de material oleoso ocorre no meio intracelular, e a concentração varia de acordo com a cepa e condições de crescimento. Há muitos fatores nutricionais e ambientais que controlam o crescimento celular e a biossíntese de bioprodutos, como por exemplo de lipídeos (HEREDIA-ARROYO et al., 2010; HUANG et al., 2010). Dentre estes fatores estão as fontes de carbono inorgânico e orgânico (MORAIS e COSTA, 2007; PEREZ-GARCIA et al. 2011), fonte de nitrogênio (ASLAN e KAPDAN, 2006), e outros macro e micro-nutrientes essenciais como magnésio e cobre (BILGRAMI e KUMAR, 1997), temperatura, pH, salinidade, velocidade de agitação (oxigênio dissolvido) (ALYABYEV et al., 2007) etc. Além destes, a relação C/N também é importante pois influencia no conteúdo lipídico armazenado nas células microalgais (HEREDIA-ARROYO et al., 2010).

Outros componentes do meio de cultivo de microalgas que influenciam no aumento da produção de determinado bioproduto são os macronutrientes. O carbono e o nitrogênio apresentam funções diversificadas em microalgas. São essenciais por serem constituintes estruturais abundantes de biomoléculas, de membranas e do meio intracelular, por participarem de processos de trocas de energia, por regularem atividades metabólicas, dentre outras funções relevantes (LOURENÇO, 2006).

Uma alternativa para aumentar a produtividade lipídica e de biomassa é o cultivo heterotrófico, no qual é realizado na ausência de luz e por isso torna-se necessário a utilização de compostos orgânicos, como fonte de carbono e energia, para o crescimento celular dentre outras funções celulares (PEREZ-GARCIA et al. 2011). Este aumento drástico de lipídeos e de biomassa é importante para diminuir o custo de produção em relação aos cultivos autotróficos. Por este motivo, a seleção de cepas de microalgas e otimização de seus crescimentos para produção de biomassa e de lipídeos, por meio do cultivo heterotrófico têm despertado interesse de vários pesquisadores (LIANG et al., 2009; PEREZ-GARCIA et al. 2011; ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012).

As fontes de carbono são os elementos mais importantes no cultivo heterotrófico de microalgas para produção de lipídeos. Segundo Wu et al. (1994) a microalga *Chlorella protothecoides* quando cultivada de modo heterotrófico utilizando acetato, glicose ou outros compostos orgânicos como fonte de carbono, produziu elevada concentração de biomassa, bem como de lipídeos. Além disso, microalgas heterotróficas podem utilizar outras fontes de carbono tal como etanol, glicerol e frutose dependendo da espécie (YOKOCHI et al., 1998). Além do carbono, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante que contribui para a matéria seca de células de microalgas, o que representa de 1 a 10 % do peso seco. Isso exclui as diatomáceas, onde o silício desempenha papel mais importante do que o nitrogênio (MARTIN-JEZEQUEL et al., 2000).

Entre as poucas espécies de microalgas apropriadas para o cultivo heterotrófico, a *Chlorella* (*Chlorophyta*) tem sido extensivamente estudada e mostrou grande potencial para a produção de lipídeos (LIANG et al., 2009; SHEN et al., 2010; O'GRADY e MORGAN, 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono (glicose) e da fonte de nitrogênio (NaNO_3) no crescimento heterotrófico e na produtividade lipídica da microalga *Chlorella homosphaera*.

3.4.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.4.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi *Chlorella homosphaera* (COSTA et al., 2006), pertencente à Coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A microalga foi mantida e cultivada em Meio BG11 (RIPPKA et al., 1979) contendo (g.L^{-1}): NaNO_3 (1,50); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,04); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,036); $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ (0,006); EDTA dissódico (0,001); Na_2CO_3 (0,02); $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,006); H_3BO_3 (2,86); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,39); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079); $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0494).

3.4.4.2 Condições de cultivo

Anteriormente à realização dos experimentos, o inóculo foi colocado em estufa termostatizada a 30 °C com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, iluminância de 2500 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia e circulação de ar estéril, para aumentar a concentração celular. Posteriormente, foi realizado acompanhamento em microscópio a fim de constatar se havia somente a microalga de interesse para os cultivos. Logo a seguir, as microalgas foram adaptadas à condição dos experimentos. O término da adaptação foi considerado o momento em que a microalga consumiu totalmente a glicose, o que variou conforme concentração da fonte de carbono. A adaptação dos ensaios realizados com 5, 10 e 15 g.L^{-1} de glicose chegaram ao fim em 1, 2 e 3 dias, respectivamente.

Os cultivos foram realizados em modo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono e energia. A adição de glicose aos cultivos foi realizada diariamente em modo batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total de glicose

(conforme delineamento experimental) durante 10 dias de experimento. Os cultivos foram realizados em agitador orbital (INNOVA®44, USA) a 150 rpm e 30 °C utilizando biorreatores fechados de 2 L com volume útil de 1,6 L. A concentração inicial da biomassa foi 0,15 g.L⁻¹. Ao final dos cultivos, as amostras foram centrifugadas e posteriormente liofilizadas.

3.4.4.3 Determinações analíticas

A amostragem dos cultivos foi realizada a cada 24 h. Amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, obtida por meio da análise de densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro (Femto Plus 700, Brasil) com auxílio de curva de calibração pré-determinada.

A concentração de glicose foi determinada no meio de cultivo a cada 24 h utilizando kit enzimático colorimétrico (Doles, Brasil), com leitura em absorvância a 510 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração.

O pH das culturas foi determinado diariamente utilizando pHmetro digital (Quimis Q400HM, Brasil).

A concentração de nitrogênio foi determinada diariamente no meio de cultivo utilizando método colorimétrico proposto por Cataldo et al. (1975).

3.4.4.4 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídeos totais foi utilizada a metodologia proposta por Folch et al. (1957) com etapa prévia de rompimento da parede celular através de banho ultrassônico. A fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia adaptada de Metcalfe et al. (1966).

A determinação de ácidos graxos foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Varian 3400CX, equipado com detector de ionização de chama e coluna ZB-WAX com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme. O gás de arraste foi hidrogênio a 0,5 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 40 °C aumentando 6 °C.min⁻¹ até 100 °C permanecendo 1 min, após a 160 °C permanecendo 5 min e a

230 °C permanecendo 10 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas. Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Belle-fonte, EUA) foram ácido butírico (C4:0), ácido capróico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido undecanóico (C11:0), ácido láurico (C12:0), ácido tridecanóico (C13:0), ácido mirístico (C14:0), ácido miristoléico (C14:1), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido *cis*-10-pentadecenóico (C15:1), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido *cis*-10-heptadecenóico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1n9), ácido linoléico (C18:2n6), ácido alfa-linolénico (C18:3n3), ácido γ -linolénico (C18:3n6), ácido araquídico (C20:0), ácido *cis*-11-eicosenóico (C20:1n9), ácido *cis*-11,14-eicosadienóico (C20:2), ácido *cis*-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3), ácido *cis*-8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6), ácido araquidônico (C20:4n6), ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5n3), ácido henicosanóico (C21:0), ácido beénico (C22:0), ácido erúico (C22:1n9), ácido *cis*-13,16-docosadienóico (C22:2), ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3), ácido tricosanóico (C23:0), ácido lignocérico (C24:0), ácido nervônico (C24:1n9).

3.4.4.5 Delineamento experimental

Para o estudo foi realizado um Planejamento Fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em que as variáveis estudadas foram concentração de glicose e concentração de NaNO_3 . As respostas analisadas foram concentração de lipídeos totais e concentração celular máxima (X_{max}). Os níveis propostos para cada variável foram baseados em ensaios preliminares que podem ser observados no item 3.3.5, Tabela 1. A escolha da melhor condição de cultivo que proporcionou maior concentração de lipídeos foi feita em função da concentração de glicose adicionada e dos cultivos realizados com Meio BG11. A decisão pelo Meio BG11 foi tomada em função do crescimento celular da microalga, quando comparado ao crescimento com Meio Basal. O efeito das variáveis estudadas sobre as respostas foi analisada estatisticamente com nível de significância de 90 % ($p \leq 0,10$).

3.4.4.6 Produtividade lipídica

A produtividade lipídica dos diferentes ensaios foi calculada levando-se em consideração a concentração celular de cada experimento, concentração de lipídeos do inóculo de onde partiram os experimentos e ao final dos 10 dias de cultivo, e o tempo de cultivo.

A produtividade lipídica foi calculada através da Equação 1.

$$P = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0} \quad (1)$$

Onde:

X_f = concentração celular final . concentração lipídica inicial ($\text{mg}_{\text{lip. L}^{-1}}$)

X_i = concentração celular inicial. concentração lipídica final ($\text{mg}_{\text{lip. L}^{-1}}$)

t_f = tempo final (d^{-1})

t_i = tempo inicial (d^{-1})

3.4.4.7 Fatores de conversão

O cálculo dos fatores de conversão $Y_{P/S1}$ (glicose em lipídeos), $Y_{P/S2}$ (nitrogênio em lipídeos), $Y_{X/S1}$ (glicose em biomassa) e $Y_{X/S2}$ (nitrogênio em biomassa) foi realizado com base nas Equações 2 e 3, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

Onde:

P = produto, no caso, lipídeos

S = substrato. S_1 = glicose e S_2 = nitrogênio

X = biomassa

A concentração celular inicial de lipídeos (P_0), foi considerada àquela obtida do inóculo de *C.homosphaera*, de onde partiram os experimentos do delineamento experimental. A quantificação do lipídeos totais do inóculo foi realizada mediante metodologia proposta por Folch et al. (1957), obtendo-se um valor de 3,17 %p/p.

A concentração inicial de glicose (S_0) foi considerada igual à concentração total de glicose adicionada no cultivo (5, 10 ou 15 g.L⁻¹), mesmo que a adição de glicose tenha sido realizada em batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total.

3.4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento da microalga *Chlorella homosphaera* em função da concentração de nitrogênio e glicose consumida ao longo dos 10 dias de cultivo, nos diferentes experimentos realizados (Tabela 1).

A glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada para cultivos heterotróficos de microalgas, como é o caso de muitas outras espécies microbianas. Elevadas taxas de crescimento e respiração são obtidas quando utiliza-se a glicose como substrato (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A microalga *C.homosphaera* apresentou comportamento diferenciado com relação à produção de biomassa e consumo de glicose e nitrogênio nos diferentes ensaios. Observou-se na Figura 1, que a microalga consumiu toda a glicose nos ensaios 1, 3, 5, 6 e 7 do planejamento experimental, os quais correspondem a menor concentração de glicose (5 g.L⁻¹) adicionada (ensaios 1 e 3) e a concentração intermediária (10 g.L⁻¹) (ensaios 5, 6 e 7). O consumo total de nitrogênio do meio de cultivo foi observado somente no 3º dia de experimento dos ensaios 5, 6 e 7.

Nota-se, para os ensaios 1, 3, 5, 6 e 7, que a microalga foi se multiplicando a medida em que foi consumida a glicose. O maior crescimento celular (1,22 g.L⁻¹) e maior conteúdo lipídico (11,70 %p/p, Tabela 1) foram observados no ensaio 3, quando a microalga utilizou como substrato a menor concentração de glicose testada (5 g.L⁻¹, Tabela 1). A microalga consumiu 64 % do nitrogênio e 100 % da glicose disponibilizados para manter suas funções celulares e crescer. Este resultado é positivo no que diz respeito a problemas de contaminação por outros micro-organismos, que

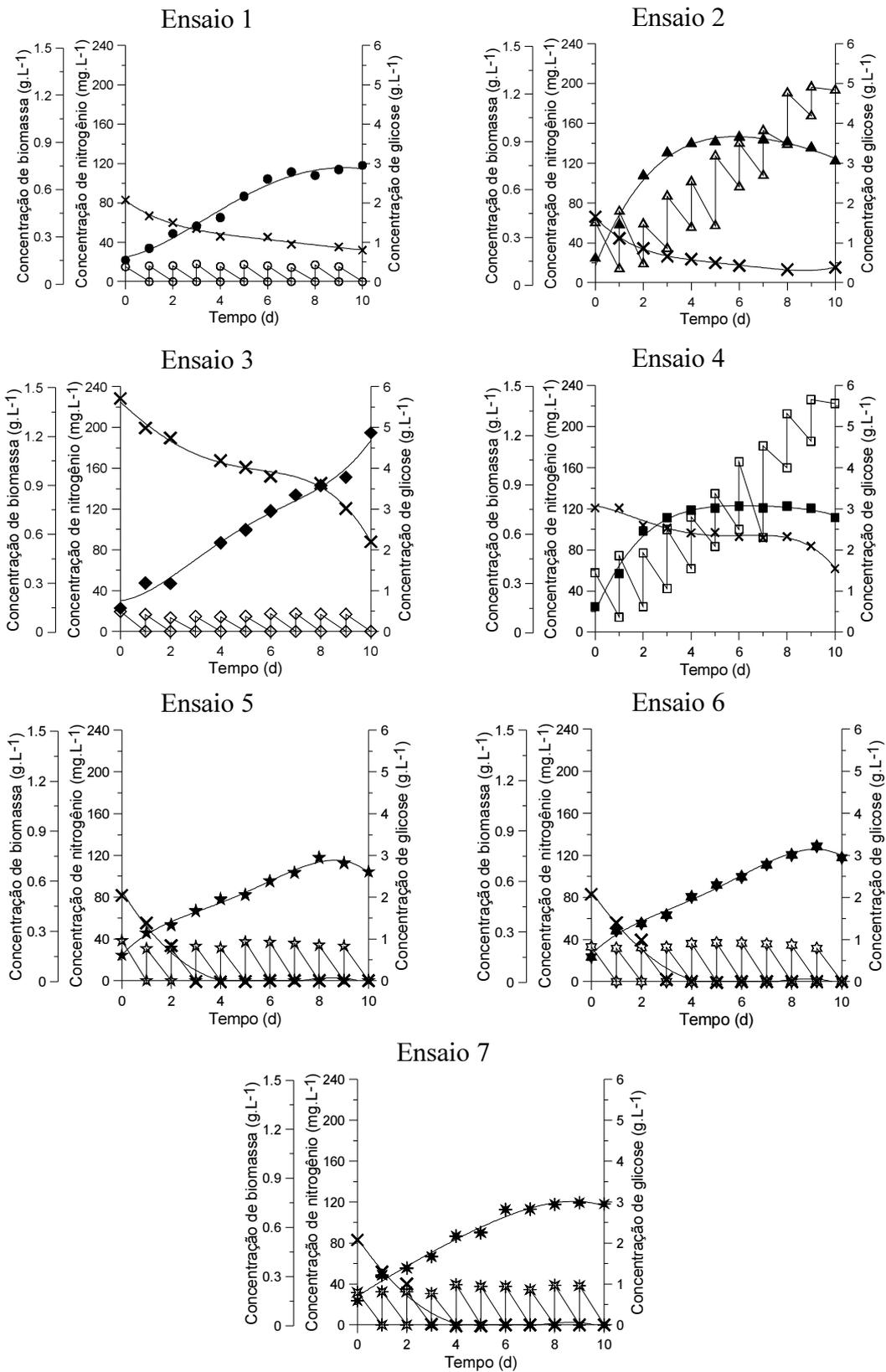
acaba sendo menor, uma vez que a microalga consome toda a glicose. Além disso, é interessante pelo fato da microalga apresentar maior crescimento utilizando a menor concentração de glicose, minimizando assim os custos de produção de biomassa.

Os ensaios 1, 2, 3 e 4 apresentaram nitrogênio disponível para a microalga *C. homosphaera* até o 10º dia de cultivo, porém em concentrações diferentes. No ensaio 1 é possível notar que a medida em que a microalga consome nitrogênio sua concentração celular aumenta, porém a concentração de lipídeos ao final deste ensaio foi de 5,94 %p/p (Tabela 1), a menor de todos os ensaios do planejamento fatorial.

No 3º dia de experimento, quando a microalga *C. homosphaera* foi cultivada nas condições dos ensaios 5, 6 e 7 (Tabela 1), a concentração de biomassa foi de aproximadamente 0,40 g.L⁻¹. Posteriormente, a microalga continuou se multiplicando (fase exponencial), atingindo 0,77 g.L⁻¹, mostrando um incremento de 0,37 g.L⁻¹ após cessar a fonte de nitrogênio. Após terminar o nitrogênio do meio esperava-se que a microalga atingisse a fase estacionária de crescimento celular e por se encontrar em uma situação de estresse (restrição de um nutriente do meio de cultivo) produzisse maior concentração de lipídeos. No entanto, a Tabela 1 mostra que os ensaios do ponto central do planejamento fatorial (5, 6 e 7) não apresentaram maior conteúdo lipídico.

Os ensaios 2 e 4 apresentaram fase estacionária de crescimento celular e acúmulo de glicose no meio de cultivo a partir do 4º e 3º dias, respectivamente. O crescimento celular máximo foi de 0,93 e 0,77 g.L⁻¹ (Tabela 1) com consumo de nitrogênio de 61 e 49 % e produção de lipídeos de 9,54 e 9,70 %p/p (Tabela 1) para os ensaios 2 e 4, respectivamente. Este resultado indica que a microalga obteve fase exponencial quando consumiu maior concentração de nitrogênio. Isto comprova que o nitrogênio é um macronutriente que apresenta funções diversificadas e importantes nas microalgas (LOURENÇO, 2006).

Figura 1 - Curvas de crescimento celular em função do consumo de glicose e de nitrogênio. Símbolos fechados (concentração de biomassa), símbolos abertos (concentração de glicose) e × (concentração de nitrogênio)



Apesar da alimentação de glicose ter sido realizada diariamente na proporção de 1/10 da concentração total de cada ensaio do planejamento experimental, é possível verificar que nos ensaios 2 e 4 a microalga não conseguiu consumir toda a glicose. Isto indica que a concentração diária adicionada (equivalente a $1,5 \text{ g.L}^{-1}$) foi elevada para esta espécie de *Chlorella* podendo ter ocasionado a saturação da célula microalgal. Um problema destes ensaios foi a susceptibilidade à contaminação por outros micro-organismos, uma vez que desde o primeiro dia de cultivo houve o acúmulo de glicose no meio e sua concentração aumentou até o 10º dia de cultivo.

Segundo Lourenço (2006), o carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para microalgas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, tal como os lipídeos. Nossos resultados vem de encontro com a teoria deste pesquisador, uma vez que, com exceção do ensaio 3, as maiores concentrações de lipídeos foram encontradas nos ensaios 2 e 4.

Nos estudos realizados por Soletto et al. (2005), Jin et al. (2006), Hsieh e Wu (2009), Feng et al. (2011), a limitação de nitrogênio apresentou efeito positivo significativo no acúmulo de lipídeos nas células de microalgas. No entanto, o crescimento celular foi inversamente proporcional ao acúmulo de lipídeos em muitas microalgas. Assim, a depleção de nitrogênio geralmente tem efeito negativo no crescimento microalgal.

Já neste estudo, observa-se que a maior concentração de lipídeos e de biomassa ocorreu no cultivo que continha a maior concentração de NaNO_3 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e que não consumiu totalmente o nitrogênio disponível, uma peculiaridade que pode estar atribuída a espécie de *Chlorella* estudada.

Uma das alternativas de se obter elevada concentração de biomassa com alto teor de lipídeos é realizar a adição intermitente de nitrogênio por batelada alimentada ou cultivo semi-contínuo de microalgas ao invés de limitar somente a fonte de nitrogênio do meio no cultivo em batelada de microalgas. Pensando nisso, Wang et al. (2012) cultivaram de modo heterotrófico a microalga *Chlorella kessleri* utilizando glicose como fonte de carbono orgânico e nitrato como fonte de nitrogênio. Neste estudo realizaram a adição intermitente de ambas as fontes de carbono e nitrogênio e obtiveram

elevados valores de concentração de biomassa ($17,60 \text{ g.L}^{-1}$) e teor de ácidos graxos totais (47,67 % em peso seco).

Os resultados encontrados para as respostas concentração máxima de biomassa e concentração de lipídeos totais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com as variáveis reais e codificadas, concentração máxima de biomassa, concentração de lipídeos totais e produtividade lipídica

Experimento	Variáveis codificadas		<i>Chlorella homosphaera</i>		
	X ₁	X ₂	X _{máx} (g.L ⁻¹)	Lipídeos (%p/p)	Produtividade lipídica (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	-1 (5)	-1 (0,5)	0,75	5,94±1,04	3,98
2	+1 (15)	-1 (0,5)	0,93	9,54±1,09	8,40
3	-1 (5)	+1 (1,5)	1,22	11,10±0,46	13,07
4	+1 (15)	+1 (1,5)	0,77	9,70±0,39	6,99
5	0 (10)	0 (1,0)	0,74	7,76±0,19	5,27
6	0 (10)	0 (1,0)	0,81	7,24±0,35	5,03
7	0 (10)	0 (1,0)	0,75	8,43±1,24	5,85

X₁: concentração de glicose (g.L⁻¹); X₂: concentração de NaNO₃ (g.L⁻¹).

O teor de lipídeos totais variou de 5,94 a 11,10 %p/p, sendo que a máxima concentração de lipídeos foi alcançada no experimento 3, o qual corresponde ao cultivo heterotrófico da microalga utilizando 5 g.L^{-1} de glicose e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO₃. Neste experimento a microalga *Chlorella homosphaera* produziu maior concentração de lipídeos (11,1 %p/p) e obteve maior crescimento celular máximo ($X_{\text{máx}}=1,22 \text{ g.L}^{-1}$). A maior produção de lipídeos e menor multiplicação celular normalmente estão intimamente ligados a limitação da fonte de nitrogênio, quando se trata de cultivo heterotrófico descontínuo. No entanto, isto não foi observado no experimento 3, no qual foi utilizada a menor concentração de glicose e maior concentração de NaNO₃. Ao contrário do que foi encontrado por outros pesquisadores no estudo com outras espécies de *Chlorella* (XU et al., 2006, LIU et al., 2008, HSIEH e WU, 2009, PEREZ-GARCIA et al., 2011, ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012; WANG et al., 2012), a microalga

Chlorella homosphaera produziu maior concentração de lipídeos quando cultivada na concentração padrão da fonte de nitrogênio (NaNO_3) do meio de cultivo ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Os experimentos 2 e 4 com produtividade lipídica de $8,40$ e $6,99 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente, acarretariam em maiores custos de produção, além de perigo de contaminação, por terem sido realizados com maior concentração de glicose (15 g.L^{-1}).

De acordo com a Tabela 1, comparando-se os experimentos 2 e 3 os resultados justificam que a redução de NaNO_3 no meio de cultivo resulta em menor crescimento celular ($0,93 \text{ g.L}^{-1}$), o que já era esperado. No entanto, o conteúdo lipídico foi reduzido ($9,54 \text{ \%p/p}$), o que pode estar associado, em particular, a espécie de *Chlorella* utilizada no estudo, já que normalmente esta condição levaria a um aumento da concentração lipídica.

No experimento 1 foi observada menor concentração celular ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$) e menor produtividade lipídica ($3,98 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Isto pode ter ocorrido devido a condição experimental estudada que foi a mais branda em relação a concentração das variáveis de estudo (5 g.L^{-1} glicose e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ NaNO_3).

A produtividade lipídica dos diferentes ensaios realizados com a microalga *Chlorella homosphaera* cultivada em modo heterotrófico variou de $3,98$ a $13,07 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Estudo em modo autotrófico realizado por Song et al. (2013), com algas verdes, as produtividades lipídicas variaram de $0,84$ a $8,82 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Chen et al. (2013) citam dois estudos realizados com a microalga *Chlorella*, no entanto com espécies diferentes. A produtividade lipídica da microalga *Chlorella emersonii* CCAP211/11N variou de $10,3$ a $12,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, enquanto que para a microalga *Chlorella* sp. F&M-M48 este valor foi de $42,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Além destes, Lee et al. (2010) cultivaram as microalgas *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. na presença de luz e, obtiveram produtividades lipídicas de $11,5$; $11,1$ e $9,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Os valores máximos de produtividade lipídica dos cultivos autotróficos são menores que àquele de melhor resultado obtido nesse estudo, com exceção do cultivo da microalga *Chlorella* sp. F&M-M48.

Por outro lado, no cultivo da microalga *Chlorella protothecoides* na ausência de luz (modo heterotrófico) utilizando diferentes fontes de carbono tais como glicose, misturas glicose/glicerol e glicerol, O'Grady e Morgan (2011) obtiveram 960 , 980 e $770 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente de produtividade lipídica. Estes valores são

elevados e superiores aos do estudo em questão e também aos dos estudos realizados na presença de luz (autotrófico).

Liang et al. (2009) realizaram estudo da microalga *Chlorella vulgaris* em condições autotrófica, heterotrófica e mixotrófica, obtendo valores de produtividade lipídica distintos. Os menores valores de produtividade lipídica ($4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foram obtidos quando o cultivo se deu de modo autotrófico utilizando CO_2 como fonte de carbono e energia. Quando os cultivos se deram de modo heterotrófico utilizando acetato e glicerol como fonte de carbono estes valores foram maiores, variando de 22 a $31 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Quando utilizaram 1 % de glicose como fonte de carbono, realizaram cultivo em modo heterotrófico e mixotrófico, obtendo 35 e $54 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ respectivamente, de produtividade lipídica. Estes resultados indicam que os cultivos na presença de luz (autotrófico), sem fonte adicional de carbono, propiciam menores teores de lipídeos. Sendo assim, para que seja possível obter maiores produtividades lipídicas o ideal é realizar cultivo em modo heterotrófico ou mixotrófico.

O teor de lipídios acumulados nas células da microalga *Chlorella protothecoides*, quando cultivada em modo heterotrófico, foi elevado (55,2 %), cerca de quatro vezes maior que os acumulados nas células, quando o cultivo ocorreu em modo autotrófico (14,57 %) (XU et al., 2006).

Os resultados dos diferentes pesquisadores desde 2006 até a atualidade mostram que o cultivo heterotrófico propicia maior acúmulo de lipídeos nas células de microalgas quando comparados com os cultivos realizados na presença de luz. No entanto, deve-se alterar as condições de cultivo quando deseja-se obter maior concentração de ácidos graxos saturados, para produção de biodiesel, ou de ácidos graxos poli-insaturados, quando a intenção é utilizá-los em alimentos funcionais.

A Tabela 2 apresenta os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e de substrato em célula ($Y_{X/S}$). Os substratos considerados são a glicose (S1) e o nitrogênio (S2), o produto (P) é a concentração de lipídeos e a célula (X) é a biomassa.

Analisando os resultados da Tabela 2, é possível verificar que a maior conversão de glicose em lipídeos ocorreu no experimento 3 ($Y_{P/S1} = 0,0261$). Com relação ao substrato nitrogênio, a maior conversão deste em lipídeos deu-se nos experimentos 2 ($Y_{P/S2} = 1,6459$) e 4 ($Y_{P/S2} = 1,1838$).

No experimento 2, além da maior conversão de nitrogênio em lipídeo ($Y_{P/S2} = 1,6459$), observa-se também a maior conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{X/S2} = 15,29$). Estes valores significam dizer que 1 g de nitrogênio produz 1,6459 g de lipídeos e 15,29 g de biomassa, respectivamente. Além disso, indicam que a limitação de nitrogênio no meio de cultivo ($0,066 \text{ g.L}^{-1}$) estimulou a produção de lipídeos (9,54 %p/p), como já era esperado. No entanto, não se esperaria que a microalga se multiplicasse 520 %, uma vez que a restrição de algum nutriente do meio de cultivo restringe também seu crescimento, apesar de estressar a microalga e estimular a biossíntese de bioprodutos de alto valor agregado.

Tabela 2 - Fatores de conversão calculados para os diferentes experimentos do planejamento fatorial

Experimento	Fatores de Conversão					
	$Y_{P/S1}$	$Y_{P/S2}$	$Y_{X/S1}$	$Y_{X/S2}$		
1	0,0079	0,7949	0,12	12,00		
2	0,0082	1,6459	0,08	15,29		
3	0,0261	0,9331	0,21	7,64		
4	0,0073	1,1838	0,07	10,51		
5	0,0052	0,6420	0,06	7,20		
6	0,0050	0,6053	0,06	7,35		
7	0,0058	0,7041	0,06	7,23		

Experimento	S_1 final	S_1 inicial	S_2 final	S_2 inicial	Lip. final	$X_{\text{máx}}$
	(g.L^{-1})					
1	0,00	5	0,032	0,082	0,0445	0,75
2	4,84	15	0,015	0,066	0,0887	0,93
3	0,00	5	0,088	0,228	0,1354	1,22
4	5,56	15	0,062	0,121	0,0746	0,77
5	0,00	10	0,000	0,082	0,0574	0,74
6	0,00	10	0,000	0,083	0,0550	0,76
7	0,00	10	0,000	0,083	0,0632	0,75

$Y_{P/S1}$: fator de conversão de glicose em lipídeos; $Y_{P/S2}$: fator de conversão de nitrogênio em lipídeos; $Y_{X/S1}$: fator de conversão de glicose em biomassa; $Y_{X/S2}$: fator de conversão de nitrogênio em biomassa; S_1 : concentração de glicose (g.L^{-1}); S_2 : concentração de nitrogênio (g.L^{-1}); Lip.: Lipídeos; $X_{\text{máx}}$: concentração celular máxima.

No experimento 3, é possível verificar que houve a maior conversão de glicose em lipídeos ($Y_{P/SI} = 0,0261$) e de glicose em biomassa ($Y_{X/SI} = 0,21$), uma vez que neste experimento foi observado maior concentração lipídica (11 %p/p) e celular ($1,22 \text{ g.L}^{-1}$). Estes fatores de conversão significam dizer que 1 g de glicose (substrato) produziu 0,0261 g de lipídeos e 0,21 g de biomassa. Esse resultado não era esperado uma vez que nesse experimento (3) a microalga *C. homosphaera* foi cultivada com a maior concentração de nitrogênio no meio de cultivo e, que normalmente não se esperaria maior concentração lipídica. Porém, era esperado a maior concentração celular, como de fato ocorreu.

No experimento 2, o substrato glicose não foi consumido completamente pela microalga *C. homosphaera*. O mesmo é observado nos experimentos 1, 2, 3 e 4 com relação ao substrato nitrogênio. De acordo com Schmidell et al. (2001), isto ocorre porque à medida que o micro-organismo se reproduz, são formados produtos do metabolismo que inibem o crescimento celular, sem mencionar o próprio substrato, que pode dificultar a atividade microbiana.

A Tabela 3 apresenta o perfil cromatográfico da microalga *C. homosphaera* cultivada na condição de menor concentração da fonte de carbono (5 g.L^{-1}) e maior concentração da fonte de nitrogênio ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) do meio de cultivo, que resultou em maior concentração de lipídeos totais (11,10 %p/p).

Observando o perfil de ácidos graxos (Tabela 3) da microalga *C. homosphaera* é possível verificar que o ácido palmítico (C16:0), precursor dos demais ácidos graxos saturados e insaturados (NELSON e COX, 2011), apareceu em maior concentração (23,6 %p/p) dentre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados.

Dentre os ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oléico (C18:1n9) que é o precursor dos ácidos graxos da família $\omega 9$, apareceu na concentração de 22,4 %p/p. Este ácido graxo é insaturado por uma insaturase Δ^{12} para formar o ácido linoléico (C18:2 $\omega 6$), que por sua vez origina os ácidos graxos α -linolénico e γ -linolénico, formando assim, os demais ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 3 - Perfil cromatográfico (%p/p) da microalga *Chlorella homosphaera* cultivada com 5 g.L⁻¹ de glicose e 1,5 g.L⁻¹ de NaNO₃

AG	Concentração (%p/p)	AG	Concentração (%p/p)
C12:0	2,5	C18:3n6	0,4
C14:0	1,6	C18:3n3	0,3
C14:1	0,9	C20:1n9	0,6
C15:0	1,7	C20:5	*
C15:1	0,8	C20:3n6	*
C16:0	23,6	C20:3n3	*
C16:1	8,1	C20:4n6	0,2
C17:0	1,6	C22:2	0,2
C17:1	*	C20:5n3	0,4
C18:0	2,4	C24:0	0,2
C18:1n9	22,4	C24:1n9	0,6
C18:2n6	16,9	C22:6n3	0,3
C20:0	14,6		

AG: Ácidos graxos; n3: ácido graxo ω3; n6: ácido graxo ω6; n9: ácido graxo ω9; *: não detectado.

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5n3) (EPA, C20:5n3) e ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3) (DHA, C22:6n3) apareceram em menores concentrações, 0,4 e 0,3 %p/p, respectivamente. Este resultado indica que a microalga *C. homosphaera* cultivada na ausência de luz com 5 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹ de NaNO₃ não consegue produzir elevada concentração destes ácidos graxos, que são importantes na prevenção de uma série de doenças cardiovasculares (ADARME-VEGA et al., 2012). Porém, esta condição de cultivo propiciou elevada concentração do ácido graxo essencial linoléico (C18:2 ω6; 16,9 %p/p), que não é produzido pelo organismo humano e deve ser obtido através da dieta.

O cultivo heterotrófico de microalgas propicia maiores concentrações de ácidos graxos tanto saturados como insaturados. Esta afirmação pode ser justificada pelos resultados encontrados por Chen et al. (2013), que estudaram o cultivo autotrófico

da microalga *Chlorella sorokiniana* e encontraram concentrações menores de ácidos graxos. O cultivo em modo heterotrófico resultou em aumento de 10,76 % do ácido palmítico (C16:0), 6,21 % do ácido palmitoléico (C16:1), 8,25 % do ácido oléico (C18:1), 7,56 % do ácido linoléico (C18:2) e 11,41 % do ácido araquídico (C20:0).

Quando comparamos o perfil de ácidos graxos desse estudo, com o estudo realizado por Radmann e Costa (2008) com a microalga *Chlorella vulgaris* cultivada de modo autotrófico, observa-se um aumento de 19,24 %, 0,59 %, 10,64 % e 0,3 % nas concentrações dos ácidos graxos C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3n3, respectivamente quando o cultivo ocorreu de modo heterotrófico.

Em outros estudos com a microalga *Chlorella*, porém de diferentes espécies, tal como a *Chlorella saccharophila* (ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012) e *Chlorella kessleri* (WANG et al., 2012), cultivadas em modo heterotrófico, foram encontradas elevadas concentrações de ácidos graxos, como o ácido graxo oléico (C18:1n9) que apareceu nas concentrações de 32,2 %p/p e 20,96 %p/p, respectivamente. Neste estudo, este ácido graxo apareceu na concentração de 22,4 %p/p, sendo 9,8 %p/p inferior ao do estudo realizado para a microalga *Chlorella saccharophila* e 1,44 %p/p superior à concentração encontrada quando cultivaram *Chlorella kessleri*.

Estudo realizado por Liu et al. (2011), em que a microalga *Chlorella zofingiensis* foi cultivada de modo fotoautotrófico e heterotrófico, mostrou características de crescimento diferentes em relação ao perfil lipídico e perfil de ácidos graxos. As células microalgais cultivadas de modo heterotrófico apresentaram maiores rendimentos de lipídeos totais, lipídeos neutros, triacilgliceróis e de ácido graxo oléico (C18:1n9) quando comparado ao modo de cultivo fotoautotrófico.

Os dados de concentração de lipídeos totais foram analisados segundo metodologia estatística, obtendo-se os resultados da Tabela 4. Analisando-se os resultados é possível verificar que houve efeito significativo ($p \leq 0,10$) da variável concentração de NaNO_3 e de sua interação com a concentração de glicose. A interação entre as variáveis foi considerada significativa ($p = 0,1022$), uma vez que o valor de p está muito perto do limite de aceitação, se distanciando apenas na terceira casa decimal.

Tabela 4 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de lipídeos totais

Variável	Coeficientes de regressão	Desvio	t(3)	p
Média*	8,53	0,40	21,07	0,0002
X ₁	0,55	0,54	1,02	0,3806
X ₂ *	1,33	0,54	2,48	0,0888
X ₁ .X ₂ *	-1,25	0,54	-2,33	0,1022

X₁: concentração de glicose (g.L⁻¹); X₂: concentração de NaNO₃ (g.L⁻¹); * variáveis estatisticamente significativas (90 % de confiança).

A Tabela 5 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para a concentração de lipídeos totais. Nesta etapa os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos.

Tabela 5 - Análise de variância da resposta concentração de lipídeos totais (%p/p) a um nível de confiança de 90 %

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Gráus de Liberdade	Quadrados médios	F _{cal}	F _{tab}	p
Regressão	13,31	2	6,65	5,73	4,32	0,0669
Resíduo	4,65	4	1,16			
Total	17,96	6				

Coeficiente de correlação R² = 0,80832

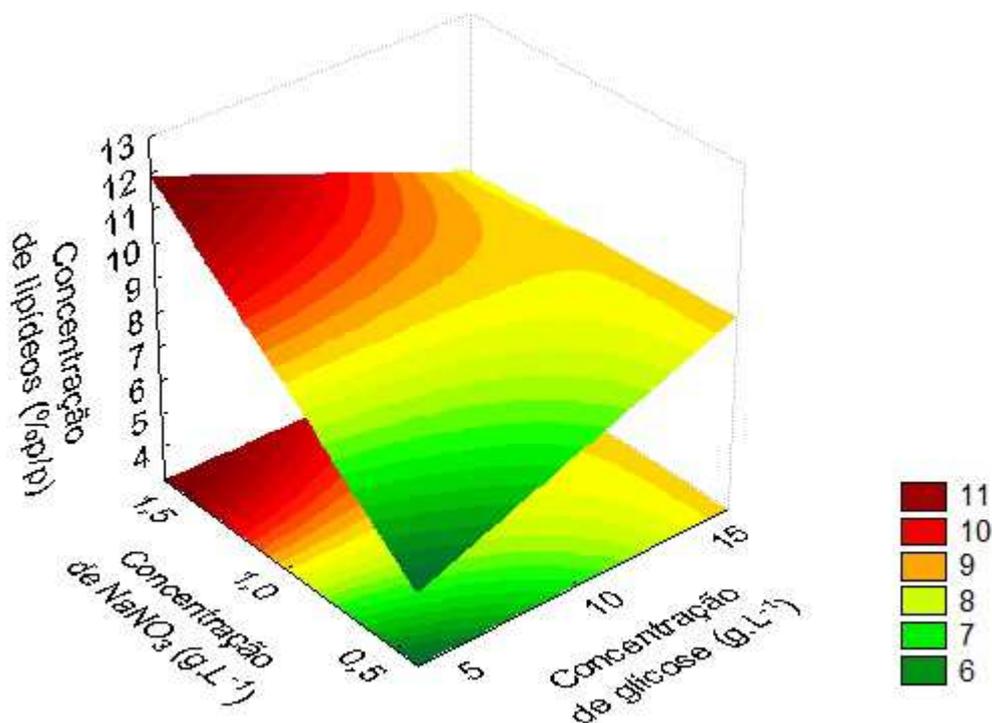
A partir dos resultados da análise estatística percebe-se que, com exceção da concentração de glicose, as outras variáveis foram significativas a um nível de confiança de 90 %. O valor do F_{calculado} para regressão foi maior que o F_{tabelado}. O modelo possui um percentual de variação explicado de 80 % (R²).

A Equação 1 representa o modelo codificado obtido que descreve a superfície de resposta da concentração de lipídeos totais, onde X₁ = concentração de glicose e X₂ = concentração de NaNO₃.

$$\text{Lipídeos totais} = 8,53 + 1,33 \cdot X_2 - 1,25 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

A partir do modelo foi possível obter a superfície de resposta (Figura 2) para estabelecer as melhores condições de concentração de glicose e concentração de NaNO_3 que proporcionam o maior teor de lipídeos totais.

Figura 2 - Superfície de resposta da concentração de lipídeos totais em relação as variáveis estudadas, concentração de glicose e concentração de NaNO_3



A superfície gerada pelo modelo (Figura 2) mostra o efeito das variáveis concentração de glicose e concentração de NaNO_3 sobre a resposta concentração de lipídeos totais. Pode-se observar que a maior concentração de lipídeos totais (11,1 %p/p) é obtida quando se utiliza a maior concentração de NaNO_3 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e menor concentração de glicose (5 g.L^{-1}). Este resultado não era esperado, uma vez que se esperaria obter maior teor de lipídeos quando a microalga fosse cultivada na menor concentração da fonte de nitrogênio.

As microalgas são micro-organismos fotoautotróficos e quando submetidos à condição de estresse (que no cultivo heterotrófico corresponde à ausência de luz e possível restrição e algum nutriente) são estimulados a produzirem maiores concentrações de um metabólito específico. Neste estudo em particular, acredita-se que

o estresse celular que propiciou maior produção de lipídeos foi o cultivo realizado na ausência de luz somada à limitação de glicose.

Além disso, é possível verificar que quando passamos a concentração de NaNO_3 do nível -1 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) para o nível +1 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) foi observado um efeito positivo de 2,66 % na resposta concentração de lipídeos totais. Já a interação das variáveis de estudo apresentou um efeito negativo de 2,49 % na resposta concentração de lipídeos totais quando o estudo foi realizado com a menor concentração de glicose (5 g.L^{-1}) e menor concentração de NaNO_3 .

A Tabela 6 apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração de lipídeos totais, os erros de ajuste e os erros relativos para cada ensaio do planejamento fatorial completo 2^2 .

Tabela 6 - Valores de concentração de lipídeos experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento fatorial completo 2^2

Ensaio	Lipídeos experimentais (%p/p)	Lipídeos previstos (%p/p)	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	5,94	5,95	-0,01	-0,17
2	9,54	8,45	1,09	11,43
3	11,10	11,11	-0,01	-0,09
4	9,70	8,61	1,09	11,24
5	7,76	8,53	-0,77	-9,92
6	7,24	8,53	-1,29	-17,82
7	8,43	8,53	-0,1	-1,19

Na Tabela 6 pode-se observar que os erros relativos foram baixos e principalmente na região desejada em que a concentração de lipídeos esta maximizada (ensaio 3). Este resultado mostra que o modelo se ajusta para todos os valores de resposta estudados.

Os valores de concentração máxima de biomassa obtidos no planejamento experimental foram analisados, obtendo-se os resultados da Tabela 7. A partir dos dados foi possível verificar que houve efeito significativo ($p \leq 0,10$) apenas da interação das

variáveis concentração de glicose e concentração de NaNO_3 na resposta concentração máxima de biomassa.

Tabela 7 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração máxima de biomassa

Variável	Coeficientes de regressão	Desvio	t(3)	p
Média*	0,85	0,04	19,10	0,0003
X_1	-0,07	0,06	-1,14	0,3361
X_2	0,08	0,06	1,31	0,2809
$X_1 \cdot X_2^*$	-0,16	0,06	-2,67	0,0759

X_1 : concentração de glicose (g.L^{-1}); X_2 : concentração de NaNO_3 (g.L^{-1}); * variáveis estatisticamente significativas (90 % de confiança).

A Tabela 8 apresenta a ANOVA dos resultados obtidos para a concentração máxima de biomassa. Nesta etapa os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos.

Tabela 8 - Análise de variância da resposta concentração máxima de biomassa (g.L^{-1}) a um nível de confiança de 90 %

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Gráus de Liberdade	Quadrados médios	F_{cal}	F_{tab}	p
Regressão	0,10	1	0,10	5,90	4,06	0,0594
Resíduo	0,08	5	0,02			
Total	0,18	6				

Coeficiente de correlação $R^2 = 0,77164$

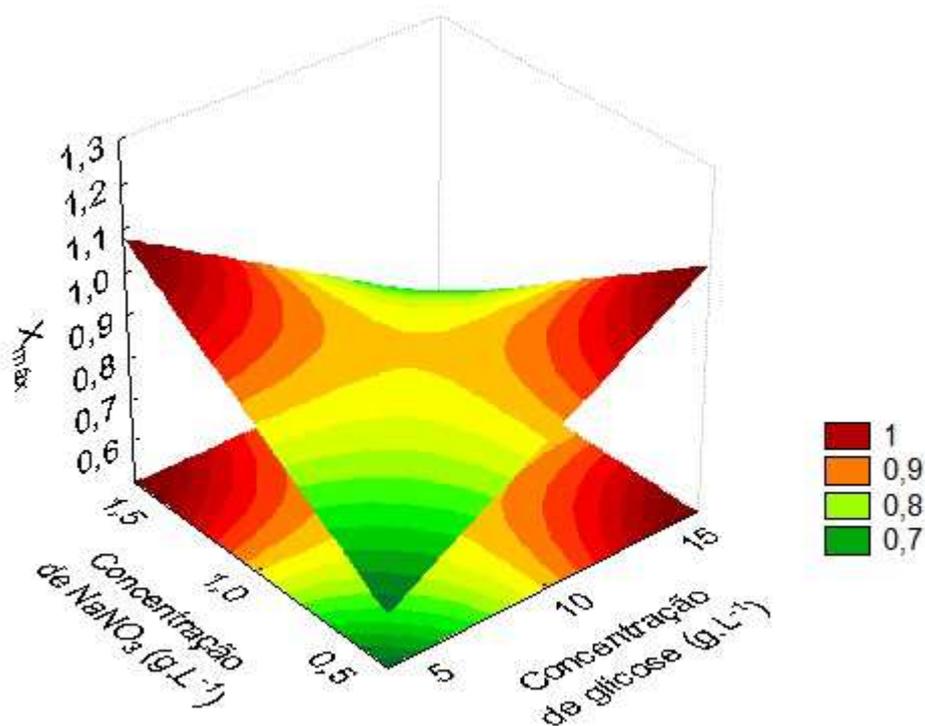
Analisando-se os resultados da análise de variância percebe-se que apenas a interação entre as duas variáveis estudadas (concentração de glicose e concentração de NaNO_3) foi significativa a um nível de confiança de 90 %. O valor do $F_{\text{calculado}}$ para regressão foi maior que o F_{tabelado} . O modelo possui um percentual de variação explicado de 77 % (R^2).

A Equação 2 representa o modelo codificado obtido que descreve a superfície de resposta da concentração máxima de biomassa, onde X_1 = concentração de glicose e X_2 = concentração de NaNO_3 .

$$\text{Biomassa máxima} = 0,85 - 0,16 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2)$$

A partir do modelo foi possível obter a superfície de resposta (Figura 3) para estabelecer as melhores condições de concentração de glicose e concentração de NaNO_3 que proporcionam a maior concentração de biomassa.

Figura 3 - Superfície de resposta da concentração máxima de biomassa em relação as variáveis estudadas concentração de glicose e concentração de NaNO_3



A superfície gerada pelo modelo (Figura 3) mostra o efeito das variáveis concentração de glicose e concentração de NaNO_3 sobre a resposta concentração máxima de biomassa.

A microalga *Chlorella homosphaera* produziu maior concentração de biomassa, com valores próximos de $1,1 \text{ g.L}^{-1}$, nas extremidades da superfície. Este

resultado sugere que a limitação de nitrogênio no meio de cultivo ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) é compensada pela maior concentração da fonte de carbono (glicose, 15 g.L^{-1}) no meio, na maior concentração de biomassa. Além disso, é possível obter a mesma concentração celular quando se utiliza a concentração padrão da fonte de nitrogênio do meio ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e restringe-se a concentração de glicose (5 g.L^{-1}). Isto significa que as variáveis estudadas devem ser analisadas em conjunto e não separadamente.

A interação entre as variáveis estudadas apresentou um efeito negativo de 0,31 % quando o cultivo foi realizado utilizando menor concentração de glicose (5 g.L^{-1}) e menor concentração de NaNO_3 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$).

A Tabela 9 apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração máxima de biomassa, os erros de ajuste e os erros relativos para cada ensaio do planejamento fatorial completo 2^2 .

Tabela 9 - Valores de biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$) experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento fatorial completo 2^2

Ensaio	$X_{\text{máx}}$ experimentais (%p/p)	$X_{\text{máx}}$ previstas (%p/p)	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	0,75	0,69	0,06	8,00
2	0,93	1,01	-0,08	-8,60
3	1,22	1,01	0,21	17,21
4	0,77	0,69	0,08	10,39
5	0,74	0,85	-0,11	-14,86
6	0,76	0,85	-0,09	-11,84
7	0,75	0,85	-0,1	-13,33

Na Tabela 9, pode-se observar que os erros relativos foram menores que 15 % em todos os ensaios do planejamento fatorial. No entanto, este erro foi maior na região em que a concentração de biomassa máxima esta maximizada (ensaio 3). Mesmo assim, pode-se considerar que o modelo se ajusta para todos os valores de resposta estudados.

3.4.6 CONCLUSÃO

O cultivo da microalga *Chlorella homosphaera* realizado com 5 g.L⁻¹ de glicose e 1,5 g.L⁻¹ de NaNO₃ apresentou maior produção de biomassa (1,22 g.L⁻¹) e maior produtividade lipídica (13,07 mg.L⁻¹.d⁻¹), com predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0 - 23,6 %p/p) e linoléico (C18:1n9 - 22,4 %p/p).

A concentração de NaNO₃ influenciou significativamente ($p \leq 0,10$) somente a concentração de lipídeos totais. No entanto, a interação entre as variáveis de estudo concentração de glicose e concentração de NaNO₃ influenciou significativamente ($p \leq 0,10$) a concentração de lipídeos totais e a concentração máxima de biomassa.

Esta espécie de *Chlorella* produziu maior concentração de lipídeos (11,1 %p/p) utilizando menor concentração da fonte orgânica de carbono (5 g.L⁻¹ de glicose), o que resulta em menores chances de contaminação por micro-organismos indesejados, menores custos de produção de biomassa e de lipídeos que podem ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais e produção de biodiesel.

3.4.7 AGRADECIMENTOS

A CAPES/Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos e ao CNPq – Rede Nanofotobiotec III, pelo apoio financeiro.

3.4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-10, 2012.
- ALYABYEV, A. J.; LOSEVA, N. L.; GORDON, L. K.; ANDREYEVA, I. N.; RACHIMOVA, G. G.; TRIBUNSKIY, V. I. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. **Thermochimica Acta**, v. 458, p. 65–70, 2007.

- ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64–70, 2006.
- BILGRAMI, K. S.; KUMAR, S. Effects of copper, lead and zinc on phytoplankton growth. **Biologia Plantarum**, v. 39, p. 315–317, 1997.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71–80, 1975.
- CHEN, C. -Y.; CHANG, J. -S.; CHANG, H. -Y.; CHEN, T. -Y.; WU, J. -H.; LEE, W. -L. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 74–81, 2013.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 429-436, 2006.
- FENG, D.; CHEN, Z.; XUE, S.; ZHANG, W. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6710-6716, 2011.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978–1995, 2010.
- HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3921-3926, 2009.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- ISLETEN-HOSOGLU, M.; GULTEPE, I.; ELIBOL, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based

- method for quantification of its neutral lipid content. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 11-19, 2012.
- JIN, H. F.; LIM, B. R.; LEE, K. Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 41, p. 2813-2824, 2006.
- LEE, J. -Y.; YOO, C.; JUN, S -Y.; AHN, C -Y.; OH, H. -M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75–S77, 2010.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.
- LIU, Z. -Y.; WANG, G. -C.; ZHOU, B. -C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717–4722, 2008.
- LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 106-110, 2011.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006, 606p.
- MARTIN-JEZEQUEL, V.; HILDEBRAND, M.; BRZEZINSKI, M. A. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 821-840, 2000.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnological Letters**, 29, 1349–1352, 2007.
- NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed S.A., 2011, 1273p.
- O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121–125, 2011.

- PEREZ-GARCIA, R. O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and ammonium removing by the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190–199, 2011.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**, vol. 2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001, 541p.
- SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. Heterotrophic Culture of *Chlorella protothecoides* in Various Nitrogen Sources for Lipid Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1674–1684, 2010.
- SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed batch cultivation of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217-224, 2005.
- SONG, M.; PEI, H.; HUA, W.; MA, G. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 245–251, 2013.
- WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. **Biomass and bioenergy**, v. 47, p. 402-409, 2012.
- WU, Q. Y.; YIN, S.; SHENG, G.; FU, J. New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 37, p. 326–335, 1994.
- XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499–507, 2006.

YOKOCHI, T.; HONDA, D.; HIGASHIHARA, T.; NAKAHARA, T. Optimisation of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacimum* SR21. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 72–76, 1998.

3.5 ARTIGO 4 - INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO HETEROTRÓFICA DE LIPÍDEOS PELA MICROALGA *Chlorella minutissima*

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

3.5.1 RESUMO

A *Chlorella*, dentre as microalgas, é possivelmente a mais utilizada como alimento, e também a mais pesquisada nos últimos tempos em cultivos heterotróficos devido ao maior rendimento de lipídeos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da concentração de carbono e nitrogênio na produtividade lipídica e produção de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada na ausência de luz. O planejamento fatorial completo utilizado foi do tipo 2^2 com três repetições no ponto central, tendo-se como fatores as concentrações de glicose (1, 5 e 9 g.L⁻¹) e de NaNO₃ (0,2; 0,75 e 1,3 g.L⁻¹), e as concentrações de lipídeos totais e de biomassa como respostas, totalizando 7 experimentos. O cultivo realizado com 9 g.L⁻¹ de glicose e 0,2 g.L⁻¹ de NaNO₃ foi o que apresentou maior concentração de lipídeos (29,38 %p/p), maior crescimento celular (0,89 g.L⁻¹) e um perfil lipídico compreendido entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados nas concentrações de 26,6 %p/p, 62,4 %p/p e 11 %p/p, respectivamente.

PALAVRAS CHAVE: Alga verde, carbono, nitrogênio, óleo de microalga.

3.5.2 ABSTRACT

The *Chlorella*, among microalgae, is possibly the most widely used as food, and also the most researched in recent times in heterotrophic growth in order to obtain higher lipid yield. The aim of this work was to study the influence of the concentration of carbon and nitrogen source on lipid productivity and biomass production of *Chlorella*

minutissima microalga grown in the absence of light. A 2² full factorial experimental design was made with three replicates at the center point, using factors glucose (1, 5 and 9 g.L⁻¹) and NaNO₃ (0.2, 0,75 and 1.3 g.L⁻¹) concentrations, and total lipid and biomass concentrations as solutions, totaling 7 experiments. The cultivation performed with 9 g.L⁻¹ of glucose and 0.2 g.L⁻¹ of NaNO₃ showed higher lipid concentration (29.38 %w/w), higher growth cell (0.89 g.L⁻¹) and a lipid profile between saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in concentrations of 26.6 %w/w, 62.4 %w/w and 11.0 %w/w, respectively.

KEY WORDS: Green Algae, carbon, nitrogen, microalga oil.

3.5.3 INTRODUÇÃO

Microalgas são uma fonte de vários produtos de alto valor agregado para os seres humanos, que vão desde carboidratos, ácidos graxos essenciais, pigmentos, suplementos alimentares, fertilizantes, produtos farmacêuticos e biocombustíveis (HEMAISWARYA, 2011).

A denominação microalgas inclui organismos com dois tipos de estrutura celular: procariótica e eucariótica. Os procarióticos têm representantes nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*. Já os eucarióticos possuem representantes nas Divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae* etc.), *Cryptophyta* e *Dinophyta* (DERNER et al., 2006).

A *Chlorella* é uma microalga eucariótica unicelular esférica, seu diâmetro varia de 5-10 µm dependendo da espécie (ILLMAN et al., 2000), trata-se de uma microalga da divisão *Chlorophyta* e ordem *Chlorococcales*. Esta microalga possui 53 % de proteínas, 23 % de carboidratos, 9 % de lipídeos e 5 % de minerais (HENRIKSON, 1994). A *Chlorella minutissima* é uma alga verde, microscópica e de água doce que possui uma rígida parede celular. Contém a maior concentração de clorofila quando comparada a outras algas (MORAIS, 2006). O interesse econômico pelo seu cultivo tem crescido consideravelmente, em função de algumas características, tais como: fácil

cultivo e conteúdo protéico elevado, podendo chegar até 65 % em matéria seca, dependendo do meio (VENKATARAMAN e BECKER, 1985).

O teor de lipídeos de microalgas é um importante parâmetro para a produção de biodiesel e obtenção de ácidos graxos poli-insaturados. No entanto, quando somente encontram estresse ambiental (por exemplo, privação de nutrientes, alta intensidade luminosa ou ausência de luz), algumas microalgas iniciam a produção de lipídeos (RODOLFI et al., 2009; TANG et al., 2011). Sendo assim, é interessante primeiramente cultivar a microalga a fim de obter alta concentração de biomassa e, em seguida, induzir o acúmulo de lipídeos sob estresse de nutrientes (JIANG et al., 2011).

Os cultivos heterotróficos e mixotróficos são muito conhecidos por propiciarem crescimento microalgal muito rápido e elevado acúmulo de material lipídico (ácidos graxos) nas células de microalgas quando comparados com os cultivos autotróficos (MITRA et al., 2012). No entanto, estes cultivos requerem a utilização de uma fonte de carbono orgânico exógena tal como glicose (HEREDIA-ARROYO et al., 2010; SHEN et al., 2010), acetato (HEREDIA-ARROYO et al., 2010), glicerol (LIANG et al., 2009, HEREDIA-ARROYO et al., 2010; O'GRADY e MORGAN, 2011), hidrolisado de milho (XU et al., 2006), entre outros.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da concentração de carbono e nitrogênio na produtividade lipídica e produção de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada na ausência de luz.

3.5.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.4.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi *Chlorella minutissima* (COSTA et al., 2006), pertencente à Coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A microalga foi mantida e cultivada em Meio BG11 (RIPPKA et al., 1979) contendo (g.L^{-1}): NaNO_3 (1,50); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,04); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,036); $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ (0,006); EDTA dissódico (0,001); Na_2CO_3 (0,02); $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,006); H_3BO_3 (2,86); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81);

ZnSO₄.7H₂O (0,222); Na₂MoO₄.2H₂O (0,39); CuSO₄.5H₂O (0,079); Co(NO₃)₂.6H₂O (0,0494).

3.5.4.2 Condições de cultivo

Antes do início dos experimentos, o inóculo da microalga *Chlorella minutissima* foi colocado em estufa termostatizada a 30 °C com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, iluminância de 2500 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia e circulação de ar estéril, para aumentar a concentração celular. Posteriormente, foi realizado acompanhamento em microscópio a fim de constatar se havia somente a microalga de interesse para os cultivos. Logo a seguir, as microalgas foram adaptadas à condição dos experimentos. O término da adaptação foi considerado o momento em que a microalga consumiu totalmente a glicose, o que variou conforme concentração da fonte de carbono. A adaptação dos ensaios realizados com 1 e 5 g.L⁻¹ de glicose terminou dentro de 1 dia, já a do ensaio com 9 g.L⁻¹ foi de 2 dias.

Os cultivos foram realizados em modo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono e energia. A adição de glicose aos cultivos foi realizada diariamente em modo batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total (conforme planejamento experimental, Tabela 1) de glicose durante 10 dias de experimento. Os cultivos foram realizados em agitador orbital (INNOVA®44, USA) a 150 rpm e 30 °C utilizando biorreatores fechados de 2 L com volume útil 1,6 L. A concentração inicial da biomassa foi de 0,15 g.L⁻¹. Ao final dos cultivos, as amostras foram centrifugadas e posteriormente liofilizadas.

3.5.4.3 Determinações analíticas

A amostragem dos cultivos foi realizada a cada 24 h. Amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, obtida por meio da análise de densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro (Femto Plus 700, Brasil) com auxílio de curva de calibração pré-determinada.

A concentração de glicose foi determinada no meio de cultivo a cada 24 h utilizando kit enzimático colorimétrico (Doles, Brasil), com leitura em absorvância a 510 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração.

O pH das culturas foi determinado diariamente em pHmetro digital (Quimis Q400HM, Brasil).

A concentração de nitrogênio foi determinada diariamente no meio de cultivo utilizando método colorimétrico proposto por Cataldo et al. (1975).

3.5.4.4 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídeos totais foi utilizada a metodologia proposta por Folch et al. (1957) com etapa prévia de rompimento da parede celular através de banho ultrassônico. A fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia adaptada de Metcalfe et al. (1966).

A determinação de ácidos graxos foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Varian 3400CX, equipado com detector de ionização de chama e coluna ZB-WAX com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de filme. O gás de arraste foi hidrogênio a 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 300 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 40 $^{\circ}\text{C}$ aumentando 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 100 $^{\circ}\text{C}$ permanecendo 1 min, após a 160 $^{\circ}\text{C}$ permanecendo 5 min e a 230 $^{\circ}\text{C}$ permanecendo 10 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas. Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Belle-fonte, EUA) foram ácido butírico (C4:0), ácido capróico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido undecanóico (C11:0), ácido láurico (C12:0), ácido tridecanóico (C13:0), ácido mirístico (C14:0), ácido miristoléico (C14:1), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido *cis*-10-pentadecenóico (C15:1), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido *cis*-10-heptadecenóico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1n9), ácido linoléico (C18:2n6), ácido alfa-linolénico (C18:3n3), ácido γ -linoléico (C18:3n6), ácido araquídico (C20:0), ácido *cis*-11-eicosenóico (C20:1n9), ácido *cis*-11,14-eicosadienóico (C20:2), ácido *cis*-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3), ácido *cis*-8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6), ácido araquidônico (C20:4n6),

ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5n3), ácido henicosanóico (C21:0), ácido beénico (C22:0), ácido erúico (C22:1n9), ácido *cis*-13,16-docosadienóico (C22:2), ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3), ácido tricosanóico (C23:0), ácido lignocérico (C24:0), ácido nervônico (C24:1n9).

3.5.4.5 Delineamento experimental

Para o estudo foi realizado um Planejamento Fatorial 2² com triplicata no ponto central, em que as variáveis estudadas foram concentração de glicose e concentração de NaNO₃. As respostas analisadas foram concentração de lipídeos totais e concentração celular máxima (X_{max}). Os níveis propostos para cada variável foram baseados em ensaios preliminares que podem ser observados no item 3.3.5, Tabela 1. A escolha da melhor condição de cultivo que proporcionou maior concentração de PUFA e $\omega 6 + \omega 3$ foi feita em função da concentração de glicose adicionada e dos cultivos realizados com Meio BG11. A decisão pelo Meio BG11 foi tomada em função do crescimento celular da microalga, quando comparado ao crescimento com Meio Basal.

O efeito das variáveis estudadas sobre as respostas foi analisada estatisticamente com nível de significância de 95 % ($p \leq 0,05$).

3.4.4.6 Produtividade lipídica

A produtividade lipídica dos diferentes ensaios foi calculada levando-se em consideração a concentração celular de cada experimento, concentração de lipídeos do inóculo de onde partiram os experimentos e ao final dos 10 dias de cultivo, e o tempo de cultivo.

A produtividade lipídica foi calculada através da Equação 1.

$$P = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0} \quad (1)$$

Onde:

X_f = concentração celular final . concentração lipídica inicial ($\text{mg}_{\text{lip.}} \text{L}^{-1}$)

X_i = concentração celular inicial. concentração lipídica final ($\text{mg}_{\text{lip.}} \text{L}^{-1}$)

t_f = tempo final (d^{-1})

t_i = tempo inicial (d^{-1})

3.5.4.7 Fatores de conversão

O cálculo dos fatores de conversão $Y_{P/S1}$ (glicose em lipídeos), $Y_{P/S2}$ (nitrogênio em lipídeos), $Y_{X/S1}$ (glicose em biomassa) e $Y_{X/S2}$ (nitrogênio em biomassa) foi realizado com base nas Equações 2 e 3, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

Onde:

P = produto, no caso, lipídeos; S = substrato. S_1 = glicose e S_2 = nitrogênio;

X = biomassa

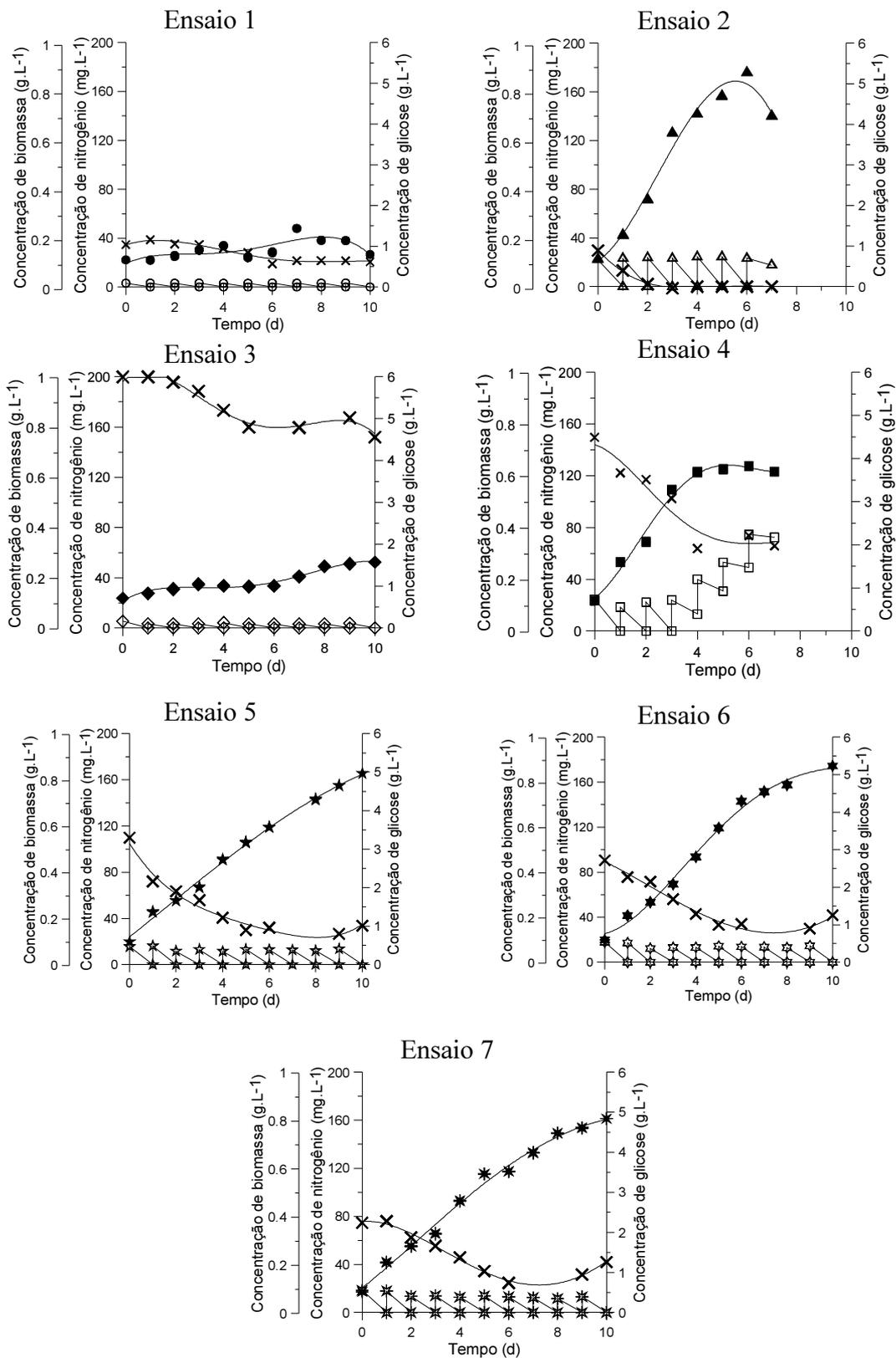
A concentração celular inicial de lipídeos (P_0), foi considerada àquela obtida do inóculo de *C.minutissima*, de onde partiram os experimentos do delineamento experimental. A quantificação do lipídeos totais do inóculo foi realizada mediante metodologia proposta por Folch et al. (1957), obtendo-se um valor de 5,87 %p/p.

A concentração inicial de glicose (S_0) foi considerada igual à concentração total de glicose adicionada no cultivo (1, 5 ou 9 g.L^{-1}), mesmo que a adição de glicose tenha sido realizada em batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total.

3.5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em função da concentração de nitrogênio e glicose consumida ao longo dos 7 e 10 dias de cultivo, nos diferentes experimentos realizados (Tabela 1).

Figura 1 - Curvas de crescimento celular em função do consumo de glicose e nitrogênio. Símbolos fechados (concentração de biomassa, símbolos abertos (concentração de glicose) e \times (concentração de nitrogênio)



Analisando-se os resultados da Figura 1, nota-se que os ensaios 2 e 4 foram finalizados 3 dias antes dos demais. Isto ocorreu porque foi verificado, por meio da redução do valor de pH, a existência de outro micro-organismo competindo pelos nutrientes do meio com a microalga *C. minutissima*. A partir desse momento não saberíamos dizer qual deles estaria produzindo o bioproduto de interesse e por este motivo resolveu-se finalizar estes cultivos.

No cultivo de microalgas, sob condições heterotróficas, a energia necessária para o crescimento é fornecida pela respiração através do uso de uma fonte de carbono orgânico como substrato (CHOJNACKA e ZIELINSKA, 2012). Além disso, neste tipo de cultivo o carbono orgânico tem papel efetivo no crescimento celular, acúmulo de lipídeos e ácidos graxos nas células de microalgas (XIONG et al., 2008; HEREDIA-ARROYO et al., 2011; WANG et al., 2012).

Nessas condições de cultivo é necessário que se faça a redução da fonte de nitrogênio a fim de conseguir desviar a rota metabólica de produção de proteínas para a produção de lipídeos. Segundo Liu et al. (2011) microalgas somente acumulam elevada concentração de lipídeo sob estresse (principalmente com restrição de nutrientes) que também limitam o crescimento das células, e por este motivo é difícil equilibrar o crescimento celular e a produção de lipídeos simultaneamente em microalgas.

Uma alternativa para obter elevada concentração de biomassa e de lipídeos é realizar cultivo em batelada alimentada da fonte de carbono e nitrogênio, conforme estudo realizado por Wang et al. (2012).

Além disso, pode-se realizar o cultivo em duas etapas: a primeira com concentração padrão de nitrogênio no meio, a fim de obter elevada produção de biomassa e, a segunda, centrifugar esta biomassa, ressuspendê-la e cultivá-la na ausência de nitrogênio objetivando aumentar o teor lipídico da biomassa (JIANG et al., 2011), porém de forma heterotrófica.

Analisando os ensaios 1, 3, 5, 6 e 7, da Figura 1, é possível verificar que a microalga verde *C. minutissima* consumiu totalmente a glicose que foi adicionada diariamente. O crescimento celular da microalga foi proporcional à concentração de glicose adicionada, o que já era esperado uma vez que a fonte de carbono contribui para a produção de biomassa. O ensaio 1, realizado com menor concentração de NaNO_3 ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), resultou em $8,02 \text{ \%p/p}$ de lipídeos, valor $13,36 \text{ \%}$ menor quando comparada

à produção lipídica obtida nos ensaios 5, 6 e 7, que foram realizados com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 . Quando limitamos a fonte nitrogenada nos cultivos, objetiva-se aumento do bioproduto lipídeos. No entanto, isto não foi observado, e o resultado pode ser justificado pela influência da concentração de glicose disponível nos diferentes ensaios.

Comparando-se os ensaios 1 e 2, que foram realizados com a mesma concentração de NaNO_3 ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), nota-se que no ensaio 1 a microalga cresceu apenas $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, consumiu aproximadamente 40 % de nitrogênio e produziu 21,36 % menos lipídeos que no ensaio 2.

Observando as curvas do ensaio 2 é possível notar uma fase exponencial marcante até o 6º dia de cultivo ($X_{\text{máx}} = 0,89 \text{ g.L}^{-1}$), momento pelo qual coincide com o consumo por completo da glicose que é fornecida como fonte de carbono e energia para a microalga realizar todas as funções celulares e se multiplicar. Além disso, verifica-se que a microalga *C. minutissima* consumiu totalmente o nitrogênio disponível no meio de cultivo ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3), que já apresentava uma concentração reduzida de NaNO_3 . Pode-se observar que a partir do 2º dia de cultivo, quando cessa a concentração de nitrogênio do meio, a microalga entra na fase exponencial, o que não era esperado. Em função do esgotamento do nutriente nitrogenado a *C. minutissima* produz maior concentração de lipídeos. De acordo com Lourenço (2006) quando as concentrações de nitrogênio disponíveis para microalgas são baixas, verifica-se diminuição marcante da taxa de divisão celular, além da redução da concentração de proteínas e de clorofila. Sendo assim, a concentração de lipídeos pode aumentar muito em relação ao total de proteínas da célula.

No ensaio 3 é possível verificar que a microalga produziu apenas $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e consumiu 25 % do nitrogênio disponível no meio de cultivo, produzindo a menor concentração de lipídeos (5,11 %p/p).

O gráfico do ensaio 4, mostra o consumo absoluto da glicose pela microalga até o 3º dia de cultivo. Posteriormente, a concentração da fonte de carbono foi aumentando gradativamente ficando disponível no meio $2,17 \text{ g.L}^{-1}$ no 7º dia de cultivo. Paralelamente, a microalga se multiplicou atingindo concentração celular máxima de $0,64 \text{ g.L}^{-1}$. Além disso, ocorreu um decréscimo de nitrogênio de 60 % e aumento da concentração celular de 300 % até o 4º dia de cultivo. A partir do 5º dia a microalga

entrou na fase estacionária e não houve mais o consumo de nitrogênio pela *C. minutissima*, ficando disponível no meio 43 %.

Os ensaios 5, 6 e 7, que correspondem ao ponto central do delineamento experimental, apresentaram comportamento semelhante. Nos três ensaios a microalga consumiu toda a glicose do meio de cultivo. Além disso, observou-se um declínio na curva de nitrogênio até o 6º dia de cultivo e posteriormente a concentração da fonte nitrogenada permaneceu constante, não havendo mais consumo pela microalga. O crescimento celular da microalga em fase exponencial ocorre até o último dia de cultivo, atingindo concentração de biomassa de aproximadamente 0,8 g.L⁻¹. A concentração de lipídeos totais foi em média 21,34 %p/p, valor muito semelhante ao encontrado no ensaio 4 (21,79 %p/p).

As microalgas do gênero *Chlorella* são algas verdes que podem crescer tanto de forma autotrófica (CO₂ como fonte de carbono e energia) como heterotrófica (carbono orgânico exógeno como fonte de carbono e energia). No entanto, estudos comprovam que quando *Chlorella zofingiensis* (LIU et al., 2011), *Chlorella protothecoides* (XU et al., 2006; HUANG et al., 2010), *Chlorella vulgaris* (LIU et al., 2008), *Chlorella* sp. (HSIEH e WU, 2009) e *Chlorella saccharophila* (ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012) foram cultivadas de modo heterotrófico seus teores lipídicos aumentaram consideravelmente.

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento experimental e as variáveis de estudo reais e codificadas e as respostas analisadas.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com as variáveis codificadas e as respostas concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g.L^{-1}) e concentração de lipídeos totais (%p/p)

Experimento	Variáveis codificadas		<i>Chlorella minutissima</i>		
	X_1	X_2	$X_{\text{máx}}$ (g.L^{-1})	Lipídeos (%p/p)	Produtividade lipídica ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
1	-1 (1)	-1 (0,2)	0,25	8,02±0,60	1,12
2	+1 (9)	-1 (0,2)	0,89	29,38±1,88	25,27
3	-1 (1)	+1 (1,3)	0,27	5,11±0,84	0,50
4	+1 (9)	+1 (1,3)	0,64	21,79±1,12	13,06
5	0 (5)	0 (0,75)	0,83	21,60±1,45	17,05
6	0 (5)	0 (0,75)	0,88	21,62±2,40	18,14
7	0 (5)	0 (0,75)	0,81	20,94±2,54	16,08

X_1 : concentração de glicose (g.L^{-1}); X_2 : concentração de NaNO_3 (g.L^{-1}).

Analisando-se os dados da Tabela 1 foi possível verificar que a concentração de lipídeos variou de 5,11 a 29,38 %p/p e que a concentração celular máxima variou de 0,20 a 0,89 g.L^{-1} . Nota-se que quando a microalga *C. minutissima* foi cultivada com 9 g.L^{-1} de glicose e 0,2 g.L^{-1} de NaNO_3 (ensaio 2) obteve-se as maiores concentrações de lipídeos (29,38 %p/p) e de biomassa (0,89 g.L^{-1}). Estes resultados justificam que maiores concentrações de carbono orgânico proporcionam maior produção de biomassa e que a limitação de nitrogênio no meio de cultivo resulta em aumento do teor de lipídeos na biomassa. Os mesmos resultados foram encontrados por outros pesquisadores no estudo com espécies da microalga *Chlorella* (PEREZ-GARCIA et al., 2011; ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012; WANG et al., 2012).

O ensaio 2 do planejamento fatorial foi finalizado no 7º dia de cultivo e mesmo assim, a produtividade lipídica (25,27 $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) deste experimento foi maior que às obtidas nos demais ensaios, os quais foram realizados em 7 e 10 dias de cultivo (Tabela 1). Sendo assim, pode-se verificar que a microalga foi muito eficiente na produção de biomassa com elevado conteúdo lipídico quando utilizou a maior concentração de glicose (9 g.L^{-1}) e menor concentração de NaNO_3 (0,2 g.L^{-1}).

A Tabela 1 mostra também que o menor crescimento microalgal ($0,20$ e $0,27 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtido nos ensaios 1 e 3, respectivamente, nos quais foram realizados com a menor concentração de glicose (1 g.L^{-1}). Este resultado já era esperado uma vez que no cultivo heterotrófico a fonte orgânica de carbono é que propicia a energia necessária para crescimento celular e desenvolvimento de algumas funções celulares importantes. No que diz respeito ao conteúdo lipídico, no ensaio 1 a microalga acumulou intracelularmente $2,91 \text{ \%p/p}$ a mais que no ensaio 3, devido a depleção de nitrogênio.

Nos ensaios 2 e 4 do planejamento fatorial, que foram realizados com a maior concentração de glicose (9 g.L^{-1}) pode-se fazer a mesma relação dos ensaios 1 e 3 no que diz respeito ao teor de lipídeos. Isto é, a restrição da fonte de nitrogênio no meio de cultivo causou estresse celular desviando a rota metabólica de produção de proteínas para a produção de lipídeos, resultando em maior concentração de óleo na biomassa da microalga *C. minutissima*. Quanto a concentração máxima de biomassa, era esperado que se atingisse maior valor no ensaio 4, uma vez que foi realizado nas condições máximas do planejamento fatorial.

Os ensaios do ponto central do planejamento experimental (5, 6 e 7) apresentaram valores de concentração de lipídeos muito semelhantes ao do ensaio 4. Estes resultados indicam que é mais vantajoso economicamente realizar cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella minutissima* utilizando menor concentração de glicose (5 g.L^{-1}) e de NaNO_3 ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$).

Comparando-se os valores de produtividade lipídica do estudo em questão (heterotrófico), com o cultivo autotrófico de vários gêneros de microalgas (SONG et al., 2013), verifica-se que o cultivo heterotrófico propiciou maiores produtividades lipídicas. Os valores variaram de $1,12$ a $25,27 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em 10 dias de cultivo, enquanto que nos cultivos autotróficos, realizados em 15 dias, estes valores variaram de $0,84$ a $7,96 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. No entanto, no estudo autotrófico realizado com a microalga *Chlorella sorokiniana* (CHEN et al., 2013), alguns valores de produtividade lipídica foram maiores, pois variaram de $10,3$ a $140,8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Este resultado indica que não somente o modo de cultivo (autotrófico ou heterotrófico) como também a cepa estudada, concentração de nutrientes no meio de cultivo, fonte de nutrientes,

temperatura, agitação, concentração de oxigênio, entre outros parâmetros, definirão o tipo e concentração de bioproduto obtido.

A Tabela 2 apresenta os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e de substrato em célula ($Y_{X/S}$). Os substratos considerados são a glicose (S1) e o nitrogênio (S2), o produto (P) é a concentração de lipídeos e a célula (X) é a biomassa.

Os maiores fatores de conversão $Y_{P/S1} = 0,0362$ e $Y_{X/S1} = 0,15$ foram obtidos no experimento 6. Sendo assim, 1 g de glicose produz 0,0362 g de lipídeos e 0,15 g de biomassa.

Tabela 2 - Fatores de conversão calculados para os diferentes experimentos do planejamento fatorial

Experimento	Fatores de Conversão					
	$Y_{P/S1}$	$Y_{P/S2}$	$Y_{X/S1}$	$Y_{X/S2}$		
1	0,0112	0,9333	0,10	8,33		
2	0,0298	8,4200	0,09	24,67		
3	0,0049	0,0049	0,12	2,50		
4	0,0191	1,5547	0,07	5,83		
5	0,0340	2,2421	0,14	8,95		
6	0,0362	3,7020	0,15	14,90		
7	0,0321	4,8727	0,13	20,00		

Experimento	S_1 final (g.L ⁻¹)	S_1 inicial (g.L ⁻¹)	S_2 final (g.L ⁻¹)	S_2 inicial (g.L ⁻¹)	Lip. final (g.L ⁻¹)	$X_{máx}$ (g.L ⁻¹)
1	0,00	1	0,021	0,033	0,020	0,25
2	0,53	9	0,000	0,030	0,2614	0,89
3	0,00	1	0,152	0,200	0,0137	0,27
4	2,17	9	0,066	0,150	0,1394	0,64
5	0,00	5	0,034	0,110	0,1792	0,83
6	0,00	5	0,042	0,091	0,1902	0,88
7	0,00	5	0,042	0,075	0,1696	0,81

$Y_{P/S1}$: fator de conversão de glicose em lipídeos; $Y_{P/S2}$: fator de conversão de nitrogênio em lipídeos; $Y_{X/S1}$: fator de conversão de glicose em biomassa; $Y_{X/S2}$: fator de conversão de nitrogênio em biomassa; S_1 : concentração de glicose (g.L⁻¹); S_2 : concentração de nitrogênio (g.L⁻¹); Lip.: Lipídeos; $X_{máx}$: concentração celular máxima.

No experimento 2 houve a maior conversão de nitrogênio em lipídeos ($Y_{P/S2} = 8,4200$) e de nitrogênio em biomassa ($Y_{X/S2} = 24,67$), o que indica que 1 g de nitrogênio forma 8,4200 g de lipídeos e 24,67 g de biomassa.

Os dados da Tabela 2 mostram que nem sempre o substrato glicose (experimentos 2 e 4) ou o substrato nitrogênio (1,3,4,5,6 e 7) se esgotavam completamente quando a concentração celular apresentava seu valor máximo, podendo ainda existir concentração residual de glicose ou nitrogênio no meio de cultura, ao término do cultivo. Segundo Schmidell et al. (2001), isto ocorre porque à medida em que o micro-organismo se reproduz, são formados produtos do metabolismo que inibem o crescimento celular, sem mencionar o próprio substrato, que pode dificultar a atividade microbiana. Além disso, estes autores mencionam que um determinado substrato, não produzirá sempre um aumento proporcional da biomassa ($Y_{X/S1}$ e $Y_{X/S2}$), sendo que uma parcela da energia, proveniente daquele consumo, é destinada à manutenção das funções vitais do micro-organismo.

A Tabela 3 apresenta o perfil cromatográfico da microalga *C. minutissima* cultivada na condição de maior concentração da fonte de carbono (9 g.L^{-1}) e menor concentração da fonte de nitrogênio ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) do meio de cultivo, que resultou em maior concentração de lipídeos totais (29,38 %p/p).

Analisando-se os resultados das Tabelas 1 e 3 e comparando-os com os valores das Tabelas 2 e 3 do item 3.3.5, é possível verificar que o cultivo da microalga *C. minutissima* com maior concentração de glicose (9 g.L^{-1}) e limitação de nitrogênio ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3) resultou no aumento de 20,98 % da concentração de lipídeos totais, diminuição em 18,6 % da concentração de ácidos graxos saturados e aumento de 28,8 % da concentração de ácidos graxos monoinsaturados. Este resultado é positivo, já que quando decidiu-se optar pela limitação de nitrogênio no meio de cultivo objetivava-se aumentar a concentração de lipídeos totais e de ácidos graxos mono e poli-insaturados. No entanto, esta condição de cultivo propiciou a redução da concentração dos ácidos graxos poli-insaturados e dos ácidos graxos essenciais ($\omega 6 + \omega 3$) em 13,65 % e 13,2 %, respectivamente, o que não era esperado.

A composição do meio de cultivo, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, é um fator crítico para o crescimento de microalgas, nas quais podem crescer

de forma autotrófica ou heterotrófica (SHEN et al., 2009; O'GRADY e MORGAN, 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Em condições heterotróficas, o conteúdo lipídico em algumas espécies de *Chlorella* pode variar de cerca de 10 a 55 % em peso seco (LIANG et al., 2009; SHEN et al., 2009; PEREZ-GARCIA, et al., 2010; O'GRADY e MORGAN, 2011; LIU et al., 2011), e a composição de ácidos graxos tem sido relatada entre C14:0 e C20:0 (PETKOV e GARCIA, 2007; O'GRADY e MORGAN, 2011; LIU et al., 2011; ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012; WANG et al., 2012).

A microalga *C. minutissima*, do estudo em questão, produziu elevada concentração do ácido graxo oléico (C18:1, 55,1 %p/p), e esta foi superior àquela produzida pelas microalgas *Chlorella protothecoides* em que a concentração de C18:1 variou de 36 a 43 %p/p (O'GRADY e MORGAN, 2011) e *Chlorella saccharophila* quando a concentração de C18:1 variou de 21,1 a 32,2 %p/p (ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012). No entanto, as cepas de *Chlorella protothecoides* (O'GRADY e MORGAN, 2011) e *Chlorella saccharophila* (ISLETEN-HOSOGLU et al., 2012) produziram maior concentração do ácido graxo linoléico (C18:2) com valores variando de 4,7 a 2,1 %p/p e 22,7 a 31,1 %p/p, respectivamente.

As concentrações de SFA (26,6 %) e MUFA (62,4 %) também foram superiores no estudo com a microalga *Chlorella minutissima* quando comparado aos estudos realizados com as microalgas *Chlorella zofingiensis* (SFA = 23,6 %, MUFA = 37,4 %) (LIU et al., 2011) e *Chlorella kessleri* (SFA variando de 34,75 a 41,34 % e MUFA de 17,51 a 24,07 % (WANG et al., 2012). A concentração de PUFA foi superior para estas duas espécies de microalgas com valores de 39,1 % para *Chlorella zofingiensis* (LIU et al., 2011) e de 40 a 44,72 % para a microalga *Chlorella kessleri* (WANG et al., 2012).

Tabela 3 - Perfil cromatográfico (%p/p) da microalga *Chlorella minutissima* cultivada com 9 g.L⁻¹ de glicose e 0,2 g.L⁻¹ de NaNO₃

AG	Concentração (%p/p)	AG	Concentração (%p/p)
C12:0	0,4	C20:0	2,9
C14:0	0,3	C20:1n9	2,3
C14:1	1,0	C20:3n6	2,9
C15:0	0,6	C20:3n3	0,2
C15:1	0,1	C20:4n6	*
C16:0	10,3	C20:5n3	*
C16:1	2,6	C22:0	3,4
C17:0	*	C22:1n9	0,2
C17:1	0,2	C22:2	3,2
C18:0	6,0	C22:6n3	0,6
C18:1n9	55,1	C23:0	*
C18:2n6	2,2	C24:0	2,7
C18:3n6	1,4	C24:1n9	0,9
C18:3n3	0,5		
SFA (%)		26,6	
MUFA (%)		62,4	
PUFA (%)		11,0	
ω6+ω3 (%)		7,8	

AG: Ácidos graxos; n3: ácido graxo ω3; n6: ácido graxo ω6; n9: ácido graxo ω9; *: não detectado; SFA: total de ácidos graxos saturados; MUFA: total de ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: total de ácidos graxos poli-insaturados.

Os dados de concentração de lipídeos totais obtidos no planejamento experimental foram analisados, obtendo-se os resultados da Tabela 4. Observando-se os dados é possível verificar que houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) somente da variável concentração de glicose.

Tabela 4 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de lipídeos totais

Variável	Coeficientes de regressão	Desvio	t(3)	P
Média*	18,35	1,52	12,06	0,0012
X ₁ *	9,51	2,01	4,72	0,0179
X ₂	-2,62	2,01	-1,30	0,2831
X ₁ .X ₂	-1,17	2,01	-0,58	0,6016

X₁: concentração de glicose (g.L⁻¹); X₂: concentração de NaNO₃ (g.L⁻¹); * variáveis estatisticamente significativas (95 % de confiança).

A Tabela 5 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para a concentração de lipídeos totais. Nesta etapa os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos.

Tabela 5 - Análise de variância da resposta concentração de lipídeos totais (%p/p) a um nível de confiança de 95 %

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	F _{cal}	F _{tab}	p
Regressão	361,82	1	361,82	22,14	6,60	0,005 3
Resíduo	81,69	5	16,34			
Total	443,51	6				

Coeficiente de correlação R² = 0,89036

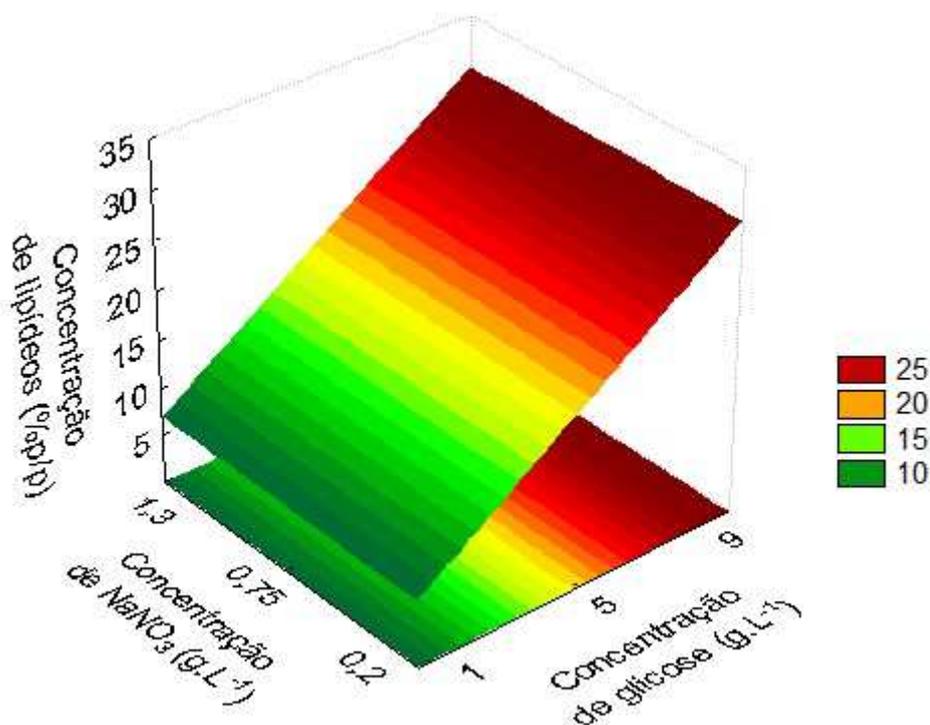
A partir dos resultados da análise estatística percebe-se que, apenas a variável concentração de glicose foi significativa a um nível de confiança de 95 %. O valor do F_{calculado} para regressão foi maior que o F_{tabelado}. O modelo possui um percentual de variação explicado de 89 % (R²).

A Equação 1 representa o modelo codificado obtido que descreve a superfície de resposta da concentração de lipídeos totais, onde X₁ = concentração de glicose.

$$\text{Lipídeos totais} = 18,35 + 9,51.X_1 \quad (1)$$

A partir do modelo obtido foi possível obter a superfície de resposta para estabelecer as melhores condições de concentração de glicose e concentração de NaNO_3 que proporcionam o maior teor de lipídeos totais. A superfície de resposta está apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Superfície de resposta da concentração de lipídeos totais em relação às variáveis estudadas concentração de glicose e concentração de NaNO_3



Os resultados obtidos na Tabela 1 são comprovados pela superfície de resposta (Figura 2), um vez que é possível verificar que a maior concentração de lipídeos, com valores próximos de 30 %p/p foi obtida quando a microalga *Chlorella minutissima* foi cultivada com 9 g.L^{-1} de glicose e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 .

Além disso, podemos verificar na Figura 2 que quando passamos a variável concentração de glicose do nível -1 (1 g.L^{-1}) para o nível +1 (9 g.L^{-1}) observamos um efeito positivo de 19 % na variável resposta concentração de lipídeos totais.

A Tabela 6 apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração de lipídeos totais, os erros de ajuste e os erros relativos para cada ensaio do planejamento fatorial completo 2^2 .

Tabela 6 - Valores de concentração de lipídeos experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento fatorial completo 2^2

Ensaio	Lipídeos experimentais (%p/p)	Lipídeos previstos (%p/p)	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	8,02	8,84	-0,82	-10,22
2	29,38	27,86	1,52	5,17
3	5,11	8,84	-3,73	-72,99
4	21,79	27,86	-6,07	-27,86
5	21,6	18,35	3,25	15,05
6	21,62	18,35	3,27	15,12
7	20,94	18,35	2,59	12,37

Na Tabela 6, pode-se observar que os erros relativos foram baixos na região desejada em que as concentrações de lipídeos totais estão maximizadas (ensaio 2, 4, 5, 6 e 7). Porém, no ensaio 3 o erro relativo foi um pouco alto (-72,99 %), mostrando que o modelo não se ajusta para baixos valores na resposta. É possível verificar que esta condição experimental é a de menor concentração de glicose (1 g.L^{-1}) e maior concentração de NaNO_3 ($1,3 \text{ g.L}^{-1}$), na qual o teor de lipídeos é menor. Assim, o fenômeno explica este valor encontrado de concentração de lipídeos totais tão baixo e erro relativo alto.

A Tabela 7 apresenta os dados da resposta concentração celular máxima, obtidos no planejamento experimental, em que pode-se verificar que não houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) das variáveis estudadas sobre a resposta $X_{\text{máx}}$, não sendo possível para esse experimento gerar um modelo estatisticamente significativo e preditivo.

Tabela 7 - Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração celular máxima

Variável	Coeficientes de regressão	Desvio	t(3)	p
Média*	0,65	0,09	6,92	0,0061
X ₁	0,25	0,24	2,02	0,1359
X ₂	-0,05	0,24	-0,46	0,6759
X ₁ .X ₂	-0,06	0,24	-0,54	0,6257

X₁: concentração de glicose (g.L⁻¹); X₂: concentração de NaNO₃ (g.L⁻¹); * variáveis estatisticamente significativas (95 % de confiança).

3.5.6 CONCLUSÃO

A microalga *Chlorella minutissima* quando cultivada com 9 g.L⁻¹ de glicose e 0,2 g.L⁻¹ de NaNO₃ (ensaio 2) apresentou maior produtividade lipídica (25,27 mg.L⁻¹.d⁻¹), com predominância do ácido graxo oléico (C18:1 - 55,1 %p/p) e maior produção de biomassa (0,89 g.L⁻¹).

A concentração de glicose influenciou significativamente (p<0,05) somente a concentração de lipídeos totais. Além disso, ambas variáveis de estudo (concentração de glicose e de NaNO₃) não possuem efeito significativo (p<0,05) na concentração máxima de biomassa.

A microalga *Chlorella minutissima* produziu maior concentração de lipídeos (29,38 %p/p) utilizando menor concentração da fonte nitrogenada (0,2 g.L⁻¹ de NaNO₃), o que resulta em economia de nutriente do meio de cultivo gerando menores custos de produção de biomassa e de lipídeos, que podem ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais e até mesmo na produção de biodiesel. Além disso, a elevada concentração de ácido oléico (C18:1, 55, 1%p/p) obtida é muito vantajosa já que este ácido graxo é o precursor dos ácidos graxos da família ω9 e vital na construção de membranas, proteção e barreira contra desidratação, por estar presente na epiderme (camada mais externa da pele), além de ter grande importância na formação dos hormônios.

3.5.7 AGRADECIMENTOS

A CAPES/Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos e ao CNPq – Rede Nanofotobiotec III, pelo apoio financeiro.

3.5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABANELAS, I. T. D.; ARBIB, Z.; CHINALIA, F. A.; SOUZA, C. O.; PERALES, J. A.; ALMEIDA, P. F.; DRUZIAN, J. I.; NASCIMENTO, I. A. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. **Applied Energy**, v. 109, p. 283–290, 2013.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71–80, 1975.
- CHEN, C. -Y.; CHANG, J. -S.; CHANG, H. -Y.; CHEN, T. -Y.; WU, J. -H.; LEE, W. -L. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 74–81, 2013.
- CHOJNACKA, K.; ZIELINSKA, A. Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 437–445, 2012.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v.17, p.429-436, 2006.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

- HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; RAVI KUMAR, R.; GANESAN, V.; ANBAZHAGAN, C. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1737-1746, 2011.
- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A., 1994, 540p.
- 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 Bioenerg**, v. 35, p. 2245-2253, 2011.
- HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3921-3926, 2009.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology, **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen médium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.
- ISLETEN-HOSOGLU, M.; GULTEPE, I.; ELIBOL, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 11-19, 2012.
- JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**. v. 88, p. 3336-3341, 2011.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.

- LIU, Z. -Y.; WANG, G. -C.; ZHOU, B. -C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717–4722, 2008.
- LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 106-110, 2011.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, 606p.
- METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.
- MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J.; LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, p. 40-48, 2012.
- MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121–125, 2011.
- PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Phycology**, v. 46, p. 800–812, 2010.
- PEREZ-GARCIA, R. O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and ammonium removing by the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190–199, 2011.
- PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 281–285, 2007.

- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipids synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2009.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**, vol. 2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001, 541p.
- SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1674–1684, 2010.
- SONG, M.; PEI, H.; HUA, W.; MAO, G. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 245–251, 2013.
- TANG, H.; ABUNASSER, N.; GARCIA, M. E. D.; CHEN, M.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3324-3330, 2011.
- VENKATARAMAN, L. V.; BECKER, E. W. **Biotechnology & utilization of algae - The Indian experience**. Mysore: Central Food Technological Research Institute, 1985, 257p.
- WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. **Biomass and bioenergy**, v. 47, p. 402-409, 2012.
- XIONG, W.; LI, X. F.; XIANG, J. Y.; WU, Q. Y. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 29-36, 2008.
- XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499–507, 2006.

3.6 ARTIGO 5 - DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES COM LIPÍDEOS EXTRAÍDOS DE MICROALGAS

¹*Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.*

3.6.1 RESUMO

O termo nanoemulsão consiste em uma dispersão muito fina composta por uma fase oleosa e uma fase aquosa, com tamanho de gota, em escala nanométrica (menor que 1000 nm). Em função do seu tamanho característico, as nanoemulsões são transparentes ou translúcidas, e possuem estabilidade contra a sedimentação. O objetivo deste trabalho foi obter nanoemulsão utilizando óleo de origem microalgal, como componente da fase oleosa. As nanoemulsões foram preparadas utilizando dois métodos: homogeneizador de alta velocidade a 10000 rpm e, associando o homogeneizador de alta velocidade a 10000 rpm e banho ultrassônico. Utilizou-se como fase aquosa a água destilada a 30 °C e o tensoativo Tween®80 nas concentrações de 0; 0,2 e 1 %p/p do total da fase aquosa. A fase oleosa foi composta pelo lipídeo extraído da microalga e uma mistura dos solventes clorofórmio e metanol (2:1). Os resultados mostraram que as nanoemulsões preparadas com o lipídeo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram bons resultados. A nanoemulsões elaboradas sem adição de Tween®80 apresentaram os menores tamanhos de gota e índices de polidispersão. Sendo assim, estas nanoemulsões podem ser utilizadas na indústria de alimentos servindo como nanocarreadores de alimentos funcionais.

PALAVRAS CHAVE: Lipídeo de microalga, nanoemulsão.

3.6.2 ABSTRACT

The nanoemulsion term consists of a very thin dispersion composed by an oily and an aqueous phase, with droplet size in nanometric scale (smaller than 1000 nm). According

to their characteristic size, nanoemulsions are transparent or translucent, and possess stability against sedimentation. The aim of this work was obtain nanoemulsion using microalgal oil source, as component of the oil phase. The nanoemulsions were prepared using only a high-speed homogenizer at 10,000 rpm (method 1), and also a combination of high speed stirring and ultrasonic bath (method 2). Was used as the aqueous phase distilled water at 30 °C and the surfactant Tween®80 at concentrations of 0, 0.2 and 1 %w/w of the aqueous phase. The oil phase was composed of the lipid extracted from the microalga and a solvent mixture of chloroform and methanol (2:1). The results showed that the nanoemulsions prepared with the lipid from *Chlorella pyrenoidosa* microalga showed good results. The nanoemulsions prepared without addition of Tween ® 80 had lower drop sizes and polydispersity indices. Thus, these nanoemulsions can be utilized in the food industry as functional food nanocarriers.

KEY WORDS: Emulsification, emulsions, microalga lipid.

3.6.3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem crescido o interesse em pesquisas que enfatizam a obtenção de nanoemulsões (NES) e métodos para a sua preparação (KOROLEVA e YURTOV, 2012).

O termo nanoemulsões é frequentemente utilizado para definir emulsões com fase interna de gotas menores que 1000 nm (CAPEK, 2004; GUTIÉRREZ et al., 2008). As nanoemulsões, são também conhecidas como miniemulsões ou emulsões submicrométricas e, consistem em emulsões muito finas com gotas de diâmetro bem reduzido (FERNANDEZ et al., 2004). Além disso, são sistemas transparentes ou translúcidos cineticamente estáveis que apresentam como característica a estabilidade física a longo prazo (sem aparente floculação ou coalescência) (TADROS et al., 2004).

As nanoemulsões podem ser preparadas mediante a utilização de métodos de baixa ou alta energia de emulsificação. Os métodos de alta energia de emulsificação utilizam dispositivos mecânicos capazes de gerar energia mecânica por meio de alta tensão de cisalhamento tais como: homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou sonificadores, nos quais requerem equipamentos específicos para

a obtenção de diâmetros reduzidos (TADROS et al., 2004; CONSTANTINIDES et al., 2008; KOROLEVA e YURTOV, 2012). Segundo Jafari et al. (2008) a produção de nanoemulsões, em escala laboratorial, ocorre em duas etapas, sendo a primeira preparar uma emulsão grosseira para posteriormente reduzir o tamanho da gota. Os métodos de baixa energia de emulsificação incluem emulsificação espontânea, difusão de solvente e inversão de fase da temperatura (TADROS et al., 2004; CONSTANTINIDES et al., 2008; KOROLEVA e YURTOV, 2012).

Os lipídeos são importantes constituintes das microalgas, compondo de 5 a 75 % da biomassa seca (SOARES, 2010). Além disso, representam um dos principais componentes das microalgas e desempenham um importante papel nutricional como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais (MORAIS, 2006a).

Os ácidos graxos nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os poli-insaturados (PUFAs) representam entre 35 e 60 % dos lipídeos totais (RICHMOND, 1986). A estimativa de produção de lipídeos por microalgas varia de 15,000 a 30,000 L.km⁻² e a extração é simples, podendo ser aplicados os métodos tradicionais usados na indústria química, incluindo a extração por solventes (RADMANN e COSTA, 2008). O aumento da produtividade da biomassa de microalgas para obtenção de material oleoso, por exemplo ácidos graxos insaturados, vem despertando interesse comercial, principalmente como fonte de ω 3, ω 6 (COHEN et al., 1995; HU et al., 2008; HUANG et al., 2010) e ω 9 (COHEN et al., 1995). No entanto, estes compostos podem ser oxidados facilmente, e por este motivo torna-se interessante nanoencapsulá-los.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoemulsão utilizando lipídeo extraído de microalga como componente da fase oleosa.

3.6.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.6.4.1 Micro-organismos

Utilizou-se a biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa* em pó produzida por Nanjing Wellchem, China e importada pela importadora Química Delaware, a fim de realização de testes para formulação das nanoemulsões.

Após definida a melhor condição de preparação de nanoemulsões, foi utilizada a biomassa da microalga *Chlorella minutissima*, cultivada com 9 g.L⁻¹ de glicose e 0,2 g.L⁻¹ de NaNO₃, na qual apresenta concentração de lipídeos igual a 29,38 %p/p.

3.6.4.2 Quantificação e extração de lipídeos totais

A quantificação e extração dos lipídeos totais (fração lipídica) da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa* foi realizada mediante metodologia proposta por Folch et al. (1957), com etapa prévia de rompimento da parede celular das microalgas por meio de banho ultrassônico.

Sendo assim, o procedimento ocorreu primeiramente pesando-se 2,5 g da biomassa microalgal em frascos de 45 mL. O processo de extração da fração lipídica iniciou-se a partir da adição de 25 mL da mistura clorofórmio e metanol (2:1). A mistura foi agitada em banho ultrassônico por 5 min e centrifugada a 6000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante da centrifugação foi recolhido em um funil de separação mediante filtração com papel filtro. Os passos anteriores foram repetidos 2 vezes. O papel filtro foi lavado com 10 mL da mistura clorofórmio e metanol, totalizando 85 mL. Foi adicionado 1/4 do volume do extrato obtido de uma solução de KCl 0,88 % (21,25 mL). Deixou-se repousar por 15 min. A mistura foi agitada cuidadosamente e a fase inferior foi removida para outro funil de separação, onde foram adicionados 1/4 do volume obtido de uma mistura de metanol e água (2:1) (21,25 mL). Deixou-se repousar por 15 min recolhendo-se a fase inferior (fase orgânica), na qual posteriormente foi filtrada em sulfato de sódio anidro para um balão de fundo chato, previamente tarado. O metanol foi evaporado em rota-evaporador a 50 °C e em seguida o balão foi levado para a estufa a 50 °C durante 2 horas a fim de eliminar o residual de metanol.

O percentual de lipídeos foi calculado através da Equação 1.

$$C_{lip} = \frac{P_f - P_i}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$C_{lip.}$ = concentração lipídica (%p/p)

P_f = peso final do balão (lipídeos + tara) (g)

P_i = peso do balão (tara) (g)

P_a = peso da amostra (g)

3.6.4.3 Preparação das nanoemulsões

O procedimento de preparação das nanoemulsões foi realizado mediante metodologia adaptada de Bouchemal et al. (2004) e procedeu-se à realização por dois métodos distintos.

Método 1: Após obtenção da fração lipídica em balão de fundo chato, procedeu-se a preparação das emulsões. A metodologia para a obtenção de emulsões apresenta três etapas:

1) Preparação da solução orgânica composta pelo óleo da microalga (400 mg) e 90 mL da mistura de solventes clorofórmio:metanol (2:1). A fase aquosa foi composta por 80 mL de água destilada a 30 °C e o surfatante Tween®80 (0 %, 0,2 % e 1 % do total da fase aquosa);

2) A fase orgânica foi injetada na fase aquosa, que estava sob agitação promovida pelo homogeneizador de alta energia de emulsificação (Ultra Turrax T25, IKA, Alemanha), a 10000 rpm. A emulsão óleo/água foi formada instantaneamente por difusão do solvente orgânico (fase dispersa) na fase aquosa contínua levando a formação das nanogotas. A agitação em Ultra Turrax permaneceu por 30 min a fim de se obter o equilíbrio do sistema;

3) Por fim, a mistura de solventes presente na emulsão foi evaporada sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Quimis) durante 20 min.

Método 2: O balão de fundo chato, contendo o óleo extraído da microalga (400 mg) e a fase aquosa (80 mL de água destilada a 30 °C e o surfatante Tween®80 na concentrações de 0 %, 0,2 % e 1 % do total da fase aquosa), foi submergido em banho ultrassônico e submetido a agitação em Ultra Turrax (10000 rpm). Após, o banho ultrassônico foi ligado e em seguida foi adicionado 90 mL da mistura de

solventes clorofórmio e metanol (2:1). Ao longo do processo, o banho ultrassônico funcionou por 30 min, sendo este tempo de funcionamento dividido em 15 min ligado, uma pausa de 5 min e mais 15 min. O Ultra Turrax permaneceu em funcionamento durante todo o processo. Ao final deste tempo, a mistura de solventes presentes na emulsão foi evaporada em evaporador rotativo (Quimis) durante 20 min e as emulsões obtidas, transferidas e armazenadas em frascos plásticos.

Para cada método de preparo de nanoemulsões foram realizados três ensaios, com o óleo da microalga *C. pyrenoidosa*, totalizando 6 experimentos. Após definir as duas melhores condições para preparação de nanoemulsões com menor tamanho de gota, foram realizados dois ensaios utilizando o óleo extraído da biomassa da microalga *C. minutissima*.

A Tabela 1 apresenta a composição das emulsões preparadas utilizando dois métodos distintos de emulsificação.

Tabela 1 - Composição das emulsões

Ensaio	Lípido microalgal (mg)	Água destilada (mL)	Mistura de solventes (mL)	Tween® 80 (%)	Emulsificação
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>					
1	400	80	90	1	UT
2	400	80	90	0,2	UT
3	400	80	90	0	UT
4	400	80	90	0	UT + BU
5	400	80	90	0,2	UT + BU
6	400	80	90	1	UT + BU
<i>Chlorella minutissima</i>					
7	400	80	90	0	UT
8	400	80	90	0	UT + BU

UT: Ultra Turrax; BU: Banho ultrassônico.

3.6.4.4 Análise do tamanho das gotas

O diâmetro médio das gotículas de óleo dispersas em água foi determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), em que 0,5 mL das amostras foram diluídos em 6 mL de água deionizada, homogeneizados até a completa dispersão e submetidos à análise para a determinação do tamanho das gotas e do índice de polidispersão. O equipamento utilizado era composto de laser helio - neônio 35 mW, comprimento de onda laser de 632,8 nm, goniômetro BI-200SM e tubo fotomultiplicador 9000 AT. As análises foram realizadas utilizando filtro de 400 µm, ângulo de 90 °, temperatura de 18 °C e tempo de duração de 2 min. O raio hidrodinâmico (R) foi determinado utilizando a equação de Stokes-Einstein ($R = (kBT / 6\pi\eta D)$), onde kB é a constante de Boltzmann, T é a temperatura (em K), D é o coeficiente de difusão e η é a viscosidade do meio. Todas as emulsões foram filtradas a vácuo com filtro de 0,45 µm, antes de proceder à medida de tamanho das gotas.

3.6.4.5 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pela mensuração da mobilidade eletroforética da partícula, que relaciona a velocidade de uma partícula sob a ação de um campo elétrico ao potencial eletrocinético da mesma. Um volume de 0,5 mL das amostras foi diluído em 6 mL de água deionizada, homogeneizados até a completa dispersão e submetidos à análise para a determinação do potencial zeta (Zeta Potential Analyzer 31450, Zeta PALS, Brookhaven Instruments). Os resultados correspondem à média de três leituras com os respectivos desvios padrão. As análises foram realizadas à temperatura de 20 °C e tiveram a duração de 2 min. Todas as emulsões foram filtradas a vácuo com filtro de 0,45 µm e procedeu-se à medição do pH antes de realizar a medida do potencial zeta.

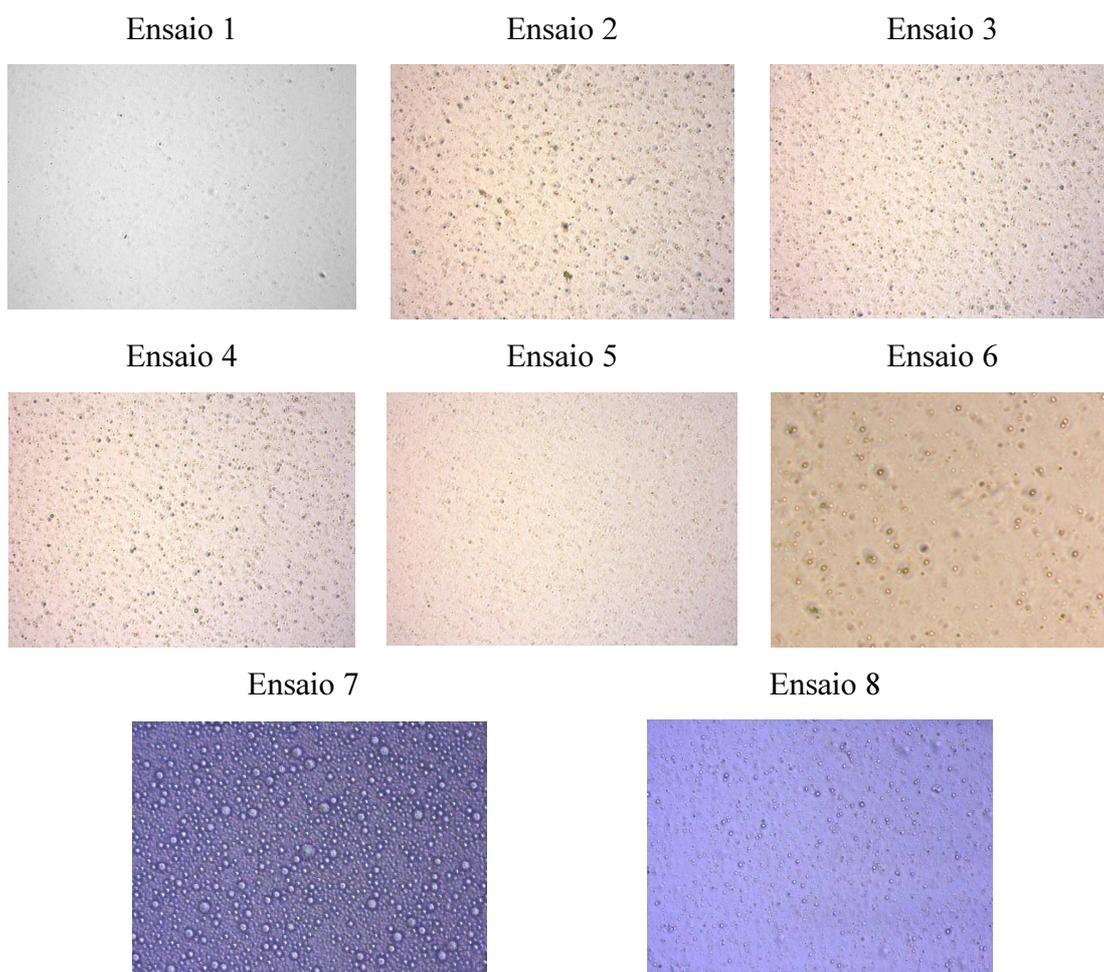
3.6.4.6 Microscopia ótica

Foi realizada microscopia ótica (Axiolab A1, Carls Zeiss, Alemanha) com objetiva de 40X de todas emulsões preparadas somente para verificação visual das gotículas de óleo dispersas em água.

3.6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as imagens obtidas por microscopia ótica das emulsões preparadas sob diferentes concentrações de tensoativo comercial e método de emulsificação.

Figura 1 - Microscopia ótica das diferentes emulsões preparadas com alta energia de emulsificação



Através da técnica de microscopia ótica (Figura 1) foi possível constatar a existência de gotículas de óleo dispersas na fase aquosa, mesmo havendo diferenças quanto ao método de emulsificação aplicado e a existência ou não de tensoativo comercial (Tween®80) na composição da emulsão.

A Tabela 2 apresenta o diâmetro médio das gotas, potencial zeta e pH das diferentes emulsões.

Tabela 2 - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes emulsões óleo em água

Ensaio	Diâmetro médio (nm) (IP)	Potencial zeta (mV)	pH
1	324,7 (0,377)	-42,46±0,38	5,5
2	240,6 (0,231)	-35,36±1,18	5,0
3	187,9 (0,114)	-41,75±0,99	5,3
4	199,7 (0,089)	-33,64±1,23	5,0
5	265,1 (0,373)	-31,35±0,53	5,0
6	209,9 (0,418)	-37,62±0,99	5,5

IP: índice de polidispersão, n = 3.

As análises de DLS e potencial zeta (Tabela 2) foram realizadas apenas uma vez, no 18º dia (ensaio 1, 2 e 3) e 12º dia (ensaio 4, 5 e 6) após a preparação das nanoemulsões (tempo zero). As amostras dos ensaios 7 e 8 não foram submetidas à determinação do tamanho das gotas, verificação do índice de polidispersão e potencial zeta, pois houve separação das fases após 3 h e 48 h de preparo, respectivamente.

Os resultados da Tabela 2 mostram que as emulsões apresentaram tamanho de partícula pequeno variando de 187,9 nm (ensaio 3) a 324,7 nm (ensaio 1) e baixo índice de polidispersão variando de 0,089 (ensaio 4) a 0,418 (ensaio 6).

De acordo com Ragelle et al. (2012), o índice de polidispersão (IP), mostra a polidispersão da emulsão variando de 0 a 1. Ou seja, é uma medida adimensional da amplitude da distribuição de tamanho de partícula. Quanto menores os valores deste índice, isto é, menores que 0,3, mais monodispersa é a suspensão.

A emulsão do ensaio 3, elaborada sem adição de tensoativo e utilizando somente Ultra Turrax para a homogeneização e quebra de partículas, foi a que

apresentou menor diâmetro de gota (187,9 nm) e índice de polidispersão correspondente a 0,114 nm. Este resultado indica que esta emulsão apresenta boa estabilidade, uma vez que mantém estas características no 18º dia após ter sido preparada.

Estudos de preparação de nanoemulsões óleo em água com adição de solvente foram realizados por Trotta et al. (2001) e Bouchemal et al. (2004). No estudo realizado por Bouchemal et al. (2004), foram preparadas várias emulsões com diferentes tipos de óleo, e o diâmetro médio das gotas variou de 171 nm a aproximadamente 950 nm.

No estudo realizado por Trotta et al. (2001), em que foi utilizado o Ultra Turrax e o tensoativo Tween®80, com diferentes solventes, verificou-se que os tamanhos das gotas foram de 215 nm, 232 nm, 278 nm quando as emulsões foram preparadas com 0,2 % de Tween®80 e com os solventes álcool benzílico, lactato de butilo e triacetina, respectivamente. Valores intermediários de diâmetro de gota (240,6 nm - ensaio 2 e 265,1 nm - ensaio 5) utilizando 0,2 % de Tween®80, foram obtidos nesse estudo, em que foi utilizado óleo de origem microalgal e a mistura dos solventes clorofórmio e metanol (2:1).

Observou-se dentre estas duas emulsões (ensaios 2 e 5), que àquela correspondente ao ensaio 5 apresentou maior diâmetro de gota, o que não era esperado já que a mesma foi preparada utilizando o método conjunto de emulsificação (Ultra Turrax + banho ultrassônico), e além disso, a medida do tamanho das gotas foi realizada em menor tempo (no 12º dia após o preparo).

Através da Tabela 2 é possível verificar que os valores de diâmetro de gota foram maiores quando as emulsões foram preparadas com adição do tensoativo Tween®80 (ensaios 1, 2, 5 e 6). Este resultado não era esperado uma vez que o tensoativo tem a função de adsorver na interface entre a fase dispersa e contínua durante o processo de emulsificação e prevenir fenômenos como floculação e coalescência. O Tween®80 é um tensoativo não iônico com elevada cadeia carbônica, e ao se distribuir na interface óleo/água, é possível que tenha contribuído para o aumento do diâmetro da gota da emulsão devido ao seu elevado peso molecular, que é de 1310 g/mol. Já o peso molecular do óleo vai depender da sua composição, que nas microalgas está na forma de triacilgliceróis (combinação do glicerol com ácidos graxos). Desta maneira, acredita-se que as amostras 3 e 4 tenham apresentado os menores diâmetros de gotas em função da

ausência do tensoativo comercial na emulsão e também pelo peso molecular do óleo da microalga ser possivelmente menor que o do Tween®80.

O potencial zeta (ζ) é um parâmetro que avalia a estabilidade da emulsão. Pode ser definido como a diferença de potencial entre a superfície de íons fortemente ligados ao redor da partícula e uma região neutra (não carregada da solução). Além disso, ele determina a repulsão eletrostática entre as gotas de óleo dispersas em água. Quanto maior é a repulsão de cargas entre duas gotas próximas, menor a sua interação e portanto, menor tendência à floculação e coalescência (MORAIS et al., 2006).

Neste contexto, quando se tem valores iguais ou maiores que 30 mV, em módulo, significa dizer que a força repulsiva da dupla camada iônica é maior que a força atrativa de van der Waals, e portanto garantem estabilidade eletrostática razoável da emulsão (ROLAND et al., 2003), evitando assim o chamado envelhecimento de Ostwald e posterior separação de fases.

Baseado nestas afirmações encontradas na literatura é possível dizer que todas as emulsões (ensaios 1 a 6) inclusive àquelas preparadas sem adição do tensoativo comercial (Tween®80) apresentam estabilidade eletrostática, uma vez que os valores de potencial zeta, em módulo, variaram de 31,35 mV a 42,46 mV. As emulsões preparadas sem adição de Tween®80 (ensaios 3 e 4) apresentaram estabilidade, com valores de potencial zeta de 41,75 mV e 33,64 mV, respectivamente. Isto pode ter acontecido, devido à existência de biosurfatante produzido pela microalga que é componente da fração insaponificável dos lipídeos totais. Além disso, estas emulsões foram mais monodispersas com relação às demais, uma vez que os valores de índice de polidispersão foram os menores.

Além disso, segundo Tadros et al. (2004) e Moraes et al. (2006b), o potencial zeta não é um parâmetro crítico, porém deve ser considerado, para emulsões preparadas com tensoativos não iônicos, como por exemplo o Tween®80 utilizado nesse estudo, devido à carga eletrônica não significativa e ao tamanho ocupado pelos grupos polares na interface.

3.6.6 CONCLUSÃO

Nanoemulsões com tamanho de gota de óleo variando de 187,9 nm a 324,7 nm foram obtidas utilizando o lipídeo extraído da microalga (comercial), como fase oleosa da emulsão. Os menores diâmetros de gota (187,9 nm e 199,7 nm) e menores índice de polidispersão (0,114 e 0,089) foram obtidos quando não se utilizou o tensoativo comercial Tween®80. As nanoemulsões preparadas com biomassa comercial apresentaram característica de boa estabilidade, indicada pelos valores, em módulo, do potencial zeta maiores que 30 mV.

As nanoemulsões, por apresentarem escala reduzida de tamanho proporcionam diversas potencialidades tal como a melhora da biodisponibilidade e solubilidade de diferentes ingredientes funcionais, como por exemplo os ácidos graxos. Além disso, estas nanoemulsões apresentam ainda mais vantagens quando são preparadas utilizando óleos ricos em $\omega 3$ (ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)), tal como o lipídeo, rico em PUFAs, extraído da biomassa de microalga.

Estudos mais aprofundados das condições de preparo das nanoemulsões ainda devem ser realizados, utilizando tanto o lipídeo extraído da biomassa comercial quanto o obtido da biomassa cultivada em laboratório, a fim de se obter nanoemulsões mais estáveis.

3.6.7 AGRADECIMENTOS

A CAPES/Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos e ao CNPq – Rede Nanofotobiotec III, pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química da UFRGS pela realização das análises de DLS e potencial zeta.

3.6.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid Interfacial Sciences**, v. 107, p. 125-155, 2004.
- CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advances Drug Delivery Reviews**, v. 60(6), p. 757-767, 2008
- COHEN, Z., NORMAN, H., HEIMER, Y. M. Microalgae as source of ω 3 fatty acids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 77, p. 1-31, 1995.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2011, 327p.
- FERNANDEZ, P.; ANDRE, V.; RIEGER, J.; KUHMLE, A. Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GUTIERREZ, J. M.; GONZÁLES, C.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, p. 245–251, 2008.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.
- HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X., CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B.; Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1191-1202, 2008.

- KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, p. 21-43, 2012.
- MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos**. 2006a. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- MORAIS, G. G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). 2006b. 158f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; ROCHA-FILHO, P. A. Canola oil/water nanoemulsions: physicochemical characterization and evaluation of electrolytes influence on emulsions stability. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 27 (7), 2006.
- RADMANN, E. M., COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RAGELLE, H.; CRAUSTE-MANCIET, S.; SEGUIN, J.; BROSSARD, D.; SCHERMAN, D.; ARNAUD, P.; CHABOT, G. G. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 452– 459, 2012.
- RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1986, 528p.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.
- SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TROTTA, M.; GALLARATEA, M.; PATTARINOB, F.; MOREL, S. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 119–128, 2001.

CAPITULO IV - Conclusão Geral

4.1 CONCLUSÃO GERAL

As microalgas constituem fonte alternativa potencial na obtenção de ácidos graxos essenciais, sendo estes os precursores de metabólitos bioativos, que estão envolvidos em diversas funções fisiológicas no organismo humano. O consumo de $\omega 3$ obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão.

Nos cultivos das microalgas do gênero *Chlorella* realizados com os Meios BG11 e Basal padrões, o Meio BG11 favoreceu a produção de biomassa, enquanto que o Meio Basal foi eficiente na obtenção de PUFA e ácidos graxos essenciais. A concentração celular máxima obtida foi $1,62 \text{ g.L}^{-1}$ para a microalga *Chlorella* sp. em Meio BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} glicose. O maior conteúdo lipídico ($22,4 \text{ \%p/p}$) foi obtido no cultivo da microalga *Chlorella homosphaera* com Meio BG11 adicionado de 10 g.L^{-1} glicose. As maiores concentrações de PUFA ($35,25 \text{ \%p/p}$) e ácidos graxos essenciais $\omega 6+\omega 3$ ($35,05 \text{ \%p/p}$) foram obtidos pela mesma microalga (*Chlorella homosphaera*), porém quando cultivada em Meio Basal sem adição de glicose. O perfil de ácidos graxos mostrou o ácido oléico (C18:1n9) como o mais abundante ($35,1 \text{ \%p/p}$) na biomassa de *Chlorella* sp. em Meio Basal adicionado de 10 g.L^{-1} glicose. No entanto, o ácido graxo saturado que apareceu em maior concentração ($32,7 \text{ \%p/p}$) foi o ácido araquídico (C20:0) no cultivo de *Chlorella minutissima* em Meio Basal sem adição de glicose.

O planejamento experimental do tipo 2^2 com três pontos centrais realizado para a microalga *Chlorella homosphaera* mostrou que o cultivo realizado com 5 g.L^{-1} de glicose e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 apresentou maior produção de biomassa ($1,22 \text{ g.L}^{-1}$) e maior produtividade lipídica ($13,07 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), com predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0 - $23,6 \text{ \%p/p}$) e linoléico (C18:1n9 - $22,4 \text{ \%p/p}$). A concentração de NaNO_3 influenciou significativamente ($p \leq 0,10$) a concentração de lipídeos totais. A interação entre as variáveis de estudo concentração de glicose e concentração de NaNO_3 influenciou significativamente ($p \leq 0,10$) a concentração de lipídeos totais e a concentração máxima de biomassa.

O planejamento experimental do tipo 2^2 com três pontos centrais realizado para a microalga *Chlorella minutissima* mostrou que quando a microalga foi cultivada com 9 g.L^{-1} de glicose e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 (ensaio 2) apresentou maior produtividade lipídica ($25,27 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), com predominância do ácido graxo oléico (C18:1 - 55,1 %p/p) e maior produção de biomassa ($0,89 \text{ g.L}^{-1}$). A concentração de glicose influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) a concentração de lipídeos totais. Além disso, ambas variáveis de estudo (concentração de glicose e de NaNO_3) não possuem efeito significativo ($p \leq 0,05$) na concentração máxima de biomassa.

O cultivo heterotrófico de *Chlorella* é eficaz na produção de ácidos graxos poli-insaturados, em especial os ácidos graxos essenciais. Estes podem ser utilizados para a alimentação, já que o metabolismo humano não é capaz de sintetizá-los. Além disso, podem contribuir na prevenção e atenuação de problemas cardíacos, doenças crônicas e controle do colesterol. Além disso, dependendo da espécie que está sendo cultivada é possível obter elevadas concentrações de lipídeos utilizando menor concentração de glicose e/ou de NaNO_3 , resultando em menores chances de contaminação por micro-organismos indesejados, menores custos de produção de biomassa e de lipídeos que podem ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais.

Nanoemulsões com tamanho de gota de óleo variando de 187,9 nm a 324,7 nm foram obtidas utilizando o lipídeo extraído da microalga (comercial), como fase oleosa da emulsão. Os menores diâmetros de gota (187,9 nm e 199,7 nm) e menores índice de polidispersão (0,114 e 0,089) foram obtidos quando não se utilizou o tensoativo comercial Tween®80. As nanoemulsões, preparadas com lipídeo de biomassa microalgal comercial, apresentaram característica de boa estabilidade, indicada pelos valores, em módulo, do potencial zeta maiores que 30 mV. No entanto, ainda são necessários maiores estudos das condições de preparo das nanoemulsões, utilizando o lipídeo extraído da biomassa comercial e o obtido da biomassa cultivada em laboratório, objetivando produção de nanoemulsões com maior estabilidade.

CAPITULO V - Referências Bibliográficas

5.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 3–15, 2009.
- ALONSO, D. L.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; RODRÍGUES-RUIZ, J.; MOLINA GRIMA, E. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Photochemistry**, v. 54, p. 461 – 471, 2000.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. *Outdoor* and *indoor* cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 85-90, 2008.
- ANTON, N.; BENOIT, J. -P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.
- ARAUJO, S. C.; GARCIA, V. M. T. Growth biochemical composition of the *diatom Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**. v. 246, p. 405-412, 2005.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas Farmacêuticas**, 2^a ed., Editora Artmed, 2005, 677p.
- BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2310-2315, 1992.
- BECKER, W. E.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, p. 105-125, 1984.
- BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion Management**, v. 38, p. 475–479, 1997.
- BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, p. 9-20, 2008.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.

- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, v. 2, Engenharia Bioquímica, 1ª Ed., São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313–321, 1999.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241–251, 2004.
- BROOKS, B. W.; RICHMOND, H. N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid-liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. In: BINKS, B. P. **Modern Aspects of Emulsion Science**. The Royal Society of Chemistry, 1998, p. 175-203.
- CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica Combo**. 5ª Ed. Cengage Learning, 2007, 845p.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid Interfacial Sciences**, v. 107, p. 125-155, 2004.
- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*. v. 14, p. 421–426, 1996.
- CHEN, G. Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607-616, 2006.
- CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green alga *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1649-1655, 2011.
- CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. Bridgewater, NJ: The Oily Press, PJ Barnes and Associates, 2003. 230p.
- CHO, S. H.; THOMPSON Jr, G. A. Properties of a fatty acid hydrolase preferentially attacking monogalactosyldiacylglycerols in *Dunaliella salina* chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 878, p. 353–359, 1986. (doi:10.1016/0005-2760(86)90243-2).
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 1, p. 21-34, 2004.

- CHU, B. -S.; ICHIKAWA, S.; KANAFUSA, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of protein-stabilized β -carotene nanodispersions by emulsification–evaporation method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1053–1062, 2007.
- COHEN, Z. Products from microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, p.421-454, 1986.
- COHEN, Z.; NORMAN, H.; HEIMER, Y. M. Microalgae as source of ω 3 fatty acids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 77, p. 1-31, 1995.
- COHEN, Z. Chemicals from microalgae. London: Taylor & Francis, 1999.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 429-436, 2006.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2011, 327p.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed. Artmed Editora S.A., 2010, 900p.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p.1959-1967, 2006.
- DUARTE, I. C. S. Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp. (*Chlorophyta*, *Chlorococcales*). 2001. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. Nanotecnologia e Nanobiotecnologia: Conceitos básicos. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAY0YAI/nanotecnologia-nanobiotecnologia?part=2#>>. Acesso em: 11 julh. 2013.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; de MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** São Paulo: Editora Artliber, 2012, 208p.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Pesquisas desenvolvidas: Impactos e perspectivas para o futuro. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/fevereiro/2a-semana/nanobiotecnologia-embrapa-inova-e-desenvolve-pesquisas-rumo-ao-futuro/>>. Acesso em: 22 out. 2009.

FENG, J.; ZENG, Y.; MA, C.; CAI, X.; ZHANG, Q.; TONG, M.; YU, B.; XU, P. The surfactant Tween 80 enhances biodesulfurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7390-7393, 2006.

FERNANDEZ, P.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, A. Nano-emulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FOLADORI, G.; INVERNIZZI, N. Os trabalhadores da alimentação e da agricultura questionam as nanotecnologias. 2007. Disponível em: <http://www.reliuita.org/nanotecnologia/trabajadores_cuestionan_nano-por.htm>. Acesso em: 22 out. 2009.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLES, C.; AND SOLANS, C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 17, p. 2076-2083, 2001.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313–332, 2005.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p. 703-726, 2010. doi: 10.1098/rsif.2009.0322.

GUTIERREZ, J. M.; GONZÁLES, C.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, p. 245–251, 2008.

- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709–732, 2012.
- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.
- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978–1995, 2010.
- HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TAYA, M.; TONE, S. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. Using a photobioreactor with a sunlight-collection device. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 81, p. 470–472, 1996.
- HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAM, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**, 2 ed. New York: Wiley & Sons Ltd., 2002, p. 451–471.
- HOLMBERG, K. Organic reactions in microemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, p. 187–196. 2003.
- HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3921–3926, 2009.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.
- HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, R50–R57, 2010a.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38–46, 2010b.
- HUNTER, R. J. **Introduction to Modern Colloid Science**. New York: Oxford University Press, 1993, 346p.
- ILLMAM, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen médium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631–635, 2000.

- JIN, D.; JIANG, X.; JING, X.; OU, Z. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, p. 215-221, 2007.
- JUNIOR, A. T. M. Algas e suas utilidades: do surgimento da vida em nosso planeta ao aquecimento global. Simpósio-Macro e microalgas. In: XXX REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA. Cadernos de cultura e ciência. Universidade Regional do Cariri, Crato, julho, v.2, n.2, 2007.
- KAMANDE, G. M.; BAAH, J.; CHENG, K. J.; McALLISTER, T. A.; SHELFORD, J. A. Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein adsorption, and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 536-542, 2000.
- KATES, M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. In: BURDON, R. H.; VAN KNIPPENBERG, P. H. (eds). **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Elsevier, Amsterdam, 1986, v. 3, part 2, p. 100-112.
- KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation for submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA S. (Ed). **Submicrons Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. [s.l.] Harwood academic publishers, 1998.
- KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, p. 21-43, 2012.
- KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E.; GONZÁLES, G. Nanoemulsões oito de laranja/água preparadas em homogeneizadores de alta pressão. **Química Nova**, v. 33, p. 295-300, 2010.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747-2757, 2002.
- KURAT, C. F.; NATTER, K.; PETSCHNIGG, J.; WOLINSKI, H.; SCHEURINGER, K.; SCHOLZ, H.; ZIMMERMANN, R.; LEBER, R.; ZECHNER, R.; KOHLWEIN, S. D. Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to

- yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 491–500, 2006. (doi:10.1074/jbc.M508414200).
- LEE, J. S.; KIM, D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C.; KOH, J. H.; CHO, H. S.; KIM, S. W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 1-4, 2002.
- LEONG, T. S. H.; WOOSTER, T. J.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, p. 721–727, 2009.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.
- LIN, T. J.; KURIHARA, H.; OTHA, H. Effects of phase inversion and surfactant location on the formation of O/W emulsions. **Journal of Society of Chemists**, v. 26, p. 121-139, 1975.
- LIU, Z. -Y.; WANG, G. -C.; ZHOU, B. -C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717–4722, 2008.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, 606p.
- MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan, 2001.
- MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química**. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**, v. 99, p. 57–63, 2006.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 85-93, 2004.

- MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J.; LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, p. 40-48, 2012.
- MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; AZZINI, R.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nanoemulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, p. 109-115, 2006.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnological Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, 4, p. 1245-1251, 2008.
- MORARU, C. I.; PANCHAPAKESAN, C. P.; HUANG, Q.; TAKJISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. I. Nanotechnology: a new frontier in food science. **Food Technology**, v. 57 p. 24–29, 2003.
- OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 558-564, 1996.
- O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121–125, 2011.
- OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 957–970, 1995. (doi:10.1105/tpc.7.7.957).
- OLGUÍN, E.; DOELLE, H.; MERCADO, G. Resource recovery through recycling of sugar processing by-products and residuals resources. *Conservation and Recycling*, 15, 85-94, 1995.
- OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa Guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes***

- Aegypti*. 2008. 128p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.
- PAULL, R.; WOLFE, J.; HERBERT, P.; SINKULA, M. Investing in nanotechnology. **Nature Publishing Group**, v. 21, p. 1144-1147, 2003.
- PEREZ-GARCIA, R. O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and ammonium removing by the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190–199, 2011.
- PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at Constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144-150, 2006.
- PINA, K. V.; PINTO, L. R.; MORATORI, R. B.; SOUZA, C. G.; BARBASTEFANO, R. G. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. In: XXV Encontro Nac. de Eng. de Produção, Porto Alegre, 2005.
- PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLES, A.; MARTÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Studies of formation of W/O nano-emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, p. 115-118, 2004.
- POST-BEITTENMILLER, D.; ROUGHAN, G.; OHLROGGE, J.B. Regulation of plant fatty acid biosynthesis; analysis of acyl-coenzyme A and acyl–acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 100, p. 923–930, 1992. (doi:10.1104/pp.100.2.923).
- PRIETO, L. M. **Produção, caracterização parcial e aplicação ambiental de rannolípídios de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado capturado no extremo sul do Brasil**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- PROSSER, A. J.; FRANCES, E. I. Adsorption and surface tension of ionic surfactants at the air-water interface: review and evaluation of equilibrium models. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 178, p. 1-40. 2001.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

- QUINTANILLA-CARVAJAL, M.; CAMACHO-DÍAZ, B. H.; MERAZ-TORRES, L. S.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; JIMENÉZ-APARICIO, A.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. **Food Engineering Reviews**, v. 2, p. 39–50, 2010.
- RADMANN, E. M.; COSTA J. A. V. Cultivo de microalgas com gases de combustão formados da geração termoelétrica. 2007. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas ao gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). Micro-algal biotechnology. Cambridge: Cambridge University, p.331-356, 1988.
- RAVEN, J. A. Sensing pH? **Plant, Cell and Environment**, v. 13, p. 721-729, 1990.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. Biologia vegetal. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.
- RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1986, 528p.
- RIEKHOF, W. R.; SEARS, B. B.; BENNING, C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1_{Cr}. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 242–252, 2005. (doi:10.1128/EC.4.2.242-252.2005).
- ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A. V. **Produção da microalga *Spirulina (Arthrospira)* em cultivo semicontínuo e diferentes concentrações de nutrientes**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A. M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, p. 59-71, 2006.

- ROESSLER, P. G. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 267, p. 521–528, 1988. (doi:10.1016/0003-9861(88)90059-8).
- SHAW, D. J. **Introduction to colloid and surface chemistry**, 4^a ed., Butterworth-Heinemann, 1992, 273p.
- SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of Oik-bearing Microalgae for Biodiesel. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 341-348, 2008.
- SUNG, K. D.; LEE, J. S.; SHIN, C. S.; PARK, S. C.; CHOI, M. J. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 269-273, 1999.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.
- TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotechnologia: principios biológicos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1990.
- VELIKOV, K. P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **Soft Matter**, v. 4, p. 1964–1980, 2008.
- VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, Cell-biology and Biotechnology**, London: Taylor & Francis, 1997.
- WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. **Biomass and bioenergy**, v. 47, p. 402-409, 2012.
- WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S.-T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1383–1389, 2009.
- WEISS, J.; DECKER, E.; McCLEMENTS, D.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T.; AWAD, T. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, p. 146–154, 2008.
- WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 273–294, 2003.

- WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Langmuir**, v. 24, p. 12758–12765, 2008.
- WU, Q. Y.; YIN, S.; SHENG, G.; FU, J. New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 37, p. 326–335, 1994.
- XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**; v. 126, p. 499–507, 2006.
- YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. **Energy Conversion & Management**, v. 36, p. 713-716, 1995.
- YIN, L. -J.; CHU, B. -S.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of [beta]-carotene nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1617–1622, 2009.
- YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. **Phytochemistry**, v. 9, p. 2963-2967, 1991.
- YOSHIHARA, K.; NAGASE, H.; EGUSHI, K.; HIRATA, K. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82,p. 351-354, 1996.
- ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 89, p. 95-101, 2008.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar tipos e concentrações de antibióticos para cada espécie de *Chlorella* quando cultivada de modo heterotrófico;
- Avaliar o uso de fontes alternativas de carbono e nitrogênio renováveis a fim de reduzir custos em cultivos de microalgas;
- Realizar cultivo heterotrófico em batelada alimentada da fonte de nitrogênio;
- Estudar a produção de lipídeos em reatores agitados mecanicamente com volume útil de 5 L;
- Testar as concentrações e a mistura de dois tensoativos (um hidrofílico e outro hidrofóbico) na preparação das emulsões;
- Nanoencapsular os lipídeos e ácidos graxos obtidos dos cultivos heterotróficos utilizando o método de *spray drying*;
- Verificar a eficiência de nanoencapsulação dos lipídeos e ácidos graxos de origem microalgal.