



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de
Microalgas por Cromatografia Gasosa.**

Marcos Antonio Gomes Pequeno

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

2^a. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Domingos da Silva

João Pessoa – PB - Brasil

Setembro/2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de
Microalgas por Cromatografia Gasosa.**

Marcos Antonio Gomes Pequeno

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Química pela Universidade Federal da
Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

2ª. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Domingos da Silva

João Pessoa – PB - Brasil

Setembro/2010

P425a *Pequeno, Marcos Antonio Gomes.*

Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa / Marcos Antonio Gomes Pequeno. -- João Pessoa: [s.n.], 2010.

65f. : il.

Orientadores: Antonio Gouveia de Souza e Denise Domingos da Silva.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN.

1. Química. 2. Microalgas. 3. Cromatografia. 4. Biodiesel.

Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa

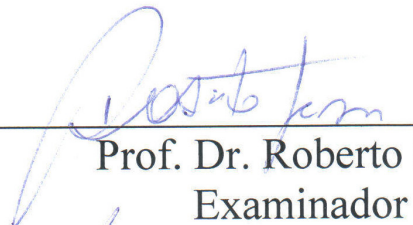
Aprovada pela banca examinadora:



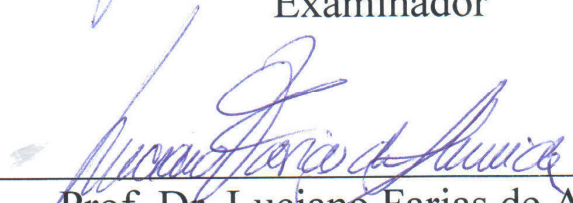
Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
Orientador/Presidente



Profa. Dra. Denise Domingos da Silva
2^a. Orientadora



Prof. Dr. Roberto Sassi
Examinador



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

**A Deus, por sua infinita bondade e misericórdia.
Por ter posto em minha vida uma família abençoada
e amigos maravilhosos. Por tudo que tenho e que
sou!**

**À minha querida esposa Luciane, por todo seu
carinho, compreensão e amor, por ter sempre
acreditado em mim.**

Aos meus amados filhos, Maria Luísa e Lucas.

**Em especial aos meus queridos Pais Rivaldo e Iraci
pelos ensinamentos adquiridos.**

Amo-os profundamente!

Com carinho, dedico.

Agradecimentos

- A toda minha família, pelo incentivo e por ter sempre acreditado em mim. Mahatima, Maria do Socorro, Fabricia, Diogo.
- Ao Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza, pela orientação, apoio e amizade.
- A Profa. Dra. Denise Domingos da Silva, pela sua Co-orientação.
- Ao Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho, pela paciência, apoio científico.
- A Profa. Dra. Ilda Antonieta pela contribuição dada.
- A Katharina Kardinelle, pelo apoio e trabalho desenvolvido
- Ao amigo Marco Aurélio Rodrigues de Melo, pela grande contribuição, apoio e compromisso, especialmente pela amizade.
- Ao amigo Manoel Barbosa Dantas, pela contribuição neste trabalho.
- A todos os alunos do PPGQ, pela amizade constituída.
- Especialmente aos queridos amigos e amigas que sempre estiveram presentes me apoiando: Andrea Melo, Rosa Virginia, Manoel Gabriel, Arquimedes Mariano, Mirella Avelino, Michelle Menezes, Ulysses Ferreira, Herbet Sales.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química.
- Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste gratificante trabalho.
- A Aline Terra pelas análises cromatográficas realizadas.

Título: “Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa.”

Autor: Marcos Antonio Gomes Pequeno

Orientadores: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza
Profa. Dra. Denise Domingos da Silva

Resumo

Uma das características mais marcantes das microalgas é a sua ampla variedade com mais de 100 mil espécies de formas, tamanhos e cores variadas, e seu crescimento de baixo impacto ambiental. Todas as microalgas são compostas de variadas proporções dos seguintes componentes: proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. O presente estudo tem como objetivo realizar análise do óleo extraído de microalgas cultivadas em condições laboratoriais controladas para avaliar espécies com maior potencial de produção de lipídeos visando a produção de biodiesel. As amostras de microalgas foram coletadas no Rio Grau, município de Alhandra, e na praia do Cabo Branco, João Pessoa-PB. Também foram usadas espécies (*Arthrospira platensis*, *Chlorella sp*, *Entomoneis alata* e *Nitzschia Closterium*) do Laboratório de Estudos Ambientais-LEA/UFPB. Os meios padrão para cultivo das microalgas foi o de Zarrouk, (1966) para a *Arthrospira platensis* e do meio Conway, para as microalgas *Entomoneis alata*, *Chlorella sp* e *Nitzschia closterium*. Os cultivos foram realizados em ambiente climatizado, sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, controlado por fotocélula externa. As curvas de crescimento das espécies foram acompanhadas por contagem celular. A biomassa microalgal obtida foi submetida à liofilização sendo o material congelado a uma temperatura de aproximadamente -40 °C por 8 horas. A extração foi realizada em um aparelho Soxhlet usando hexano como solvente, utilizando 26 g do material. As análises cromatográficas dos óleos extraídos das microalgas (*Arthrospira platensis*, *Chlorella sp*, *Entomoneis alata* e *Nitzschia closterium*) foram realizadas em um Cromatógrafo com detector espectrômetro de massa, injetor split/splitless. Os tempos de retenção dos solutos (ácidos) dos óleos extraídos das microalgas foram comparados com os tempos de retenção do óleo de *Glycine Max (L.) Merr* (Soja), *Brassica napus L. Var. oleifera* (canola) e *Arachis hypogaeae L.* (Amendoim), além de usar a biblioteca do software para identificá-los. As análises indicaram a presença de diversos ácidos graxos com predominância do palmítico (C16:0) para as microalgas *Arthrospira platensis* (56,94%) e *Chlorella sp* (35,97%) $t_r = 14,78$ min e o palmitoléico (C16:1cis9) para *Entomoneis alata* (23,34%) e *Nitzschia Closterium* (18,93%) $t_r = 15,03$ min. Os cromatogramas apresentaram uma boa resolução entre os solutos, indicando uma boa performance de separação sem a presença de adsorção no perfil dos picos dos cromatogramas. Portanto entre os óleos das microalgas analisadas a *Arthrospira platensis* e *Chlorella sp* apresentam-se como promissoras com maior teor de ácidos saturados que tem a vantagem de apresentar uma maior estabilidade à auto-oxidação, e conseqüentemente poderão favorecer melhor propriedade ao biodiesel.

Palavras-chave: Microalgas, Cromatografia, Biodiesel

Title: “Evaluation of the Potential Production of Oils obtained from Microalgae by Gas Chromatography”

Author: Marcos Antonio Gomes Pequeno

Advisors: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza
Prof. Dra. Denise Domingos da Silva

Abstract

And analyzed *Chlorella* sp present them selves as promising with higher content of saturated acids which have the advantage of providing greater stability to autoxidation and hence may promote better property to biodiesel. The aim of the present study is to perform analysis of the oil extracted from algae grown in laboratory conditions controlled to evaluate species with the highest potential for production of lipids in the production of biodiesel. The samples of algae were collected in the River Level, municipality of Alhandra, and on the beach of Cabo Branco, João Pessoa - PB They were also used species (*Arthrospira platensis*, *Chlorella* sp *Entomoneis alata* and *Nitzschia Closterium*) of the Laboratory of Environmental Studies-LEA/UFPB. The media standard for cultivation of microalgae was Zarrouk, (1966) for the *Arthrospira platensis* and the medium Conway, for microalgae *Entomoneis alata*, *Chlorella* sp and *Nitzschia closterium*. The cultures were performed in a temperature-controlled environment, lighting system supplied by fluorescent lamps and photoperiod of 12 hours light/dark, controlled by photocell foreign. The growth curves of the species were accompanied by cell counts. The biomass microalgal obtained was subjected to freeze the material frozen at a temperature of approximately -40 °C for 8 hours. The extraction was performed in a Soxhlet apparatus using hexane as a solvent, using 26 g of the material. The chromatographic analyzes of the oils extracted from the microalgae (*Arthrospira platensis*, *Chlorella* sp *Entomoneis alata* and *Nitzschia closterium*) were performed in a Gas Chromatograph with mass spectrometer detector, injector split/splitless injector. The retention times of the solutes (acids) of the oils extracted from the microalgae were compared with the retention times of oil of *Glycine Max* (L.) Merr (soybean), *Brassica napus* L. var. The analyzes indicated the presence of several fatty acids with predominance of palmitic acid (C16:0) in the microalgae *Arthrospira platensis* (56.94 %) and *Chlorella* sp (35, 97 %) $t_r = 14.78$ min and palmitoleic acid (C16:1cis9) for *Entomoneis alata* (23.34 %) and *Nitzschia Closterium* (18.93 %) $t_r = 15.03$ min. The chromatograms showed a good resolution between the solute, indicating a good performance of separation without the presence of adsorption in the profile of the peaks of chromatograms. Therefore among the oils of microalgae analyzed the *Arthrospira platensis* and *Chlorella* sp present as promising with higher content of saturated which has the advantage of presenting greater stability to the autoxidation, and therefore can promote better ownership for biodiesel.

Keywords: Microalgae, Chromatography, Biodiesel

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTAS DE TABELAS	xi
LISTAS DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01.
2. OBJETIVOS	05.
2.1. Objetivo Geral	05.
2.2. Objetivos Especificos	05.
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	06.
3.1. Histórico do Cultivo de Microalgas	06.
3.2. Cultivo de Microalgas	06.
3.3. Crescimento das Microalgas	07.
3.4. Fatores Limitantes para o Crescimento das Microalgas	08.
3.5. Meio de Cultivo.....	10.
3.6. Sistemas de Cultivo.....	11.
3.7. Medidas de Crescimento das Microalgas.....	13.
3.8. Densidade Óptica	14.
3.9. Macronutrientes	15.
3.10. Micronutrientes	17.
3.11. Vitaminas	18.
3.12. Quelantes	19.
4. PARTE EXPERIMENTAL	20.
4.1. Meio para o Cultivo	20.
4.2. Condições de Cultivo	20.

4.3.	Curva de Crescimento das Microalgas	20.
4.4.	Obtenção e Manutenção das Culturas	21.
4.5.	Preparação dos Meios de Cultura	22.
4.6.	Obtenção da Biomassa Seca	25.
4.7.	Colheita e Filtração	26.
4.8.	Métodos de Secagem	26.
4.9.	Extração do Óleo das Microalgas	26.
4.10.	Determinação Cromatográfica dos Triacilglicerídeos (TAG) em Microalgas	27.
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28.
5.1.	Curvas de Crescimento das Microalgas	28.
5.2.	Monitoramento do pH do Cultivo de Microalgas.....	30.
5.3.	Fotografia das Microalgas Obtidas em Microscópio e Características Gerais das Espécies.....	33.
5.4.	Análise Cromatográfica do Óleo de Microalgas	35.
5.4.1.	Microalgas <i>Arthrospira platensis</i>	35.
5.4.2.	Microalgas <i>Chlorella sp</i>	36.
5.4.3.	Microalgas <i>Entomoneis alata</i>	38.
5.4.4.	Microalgas <i>Cylindrotheca closterium</i>	40.
5.4.5.	Análise Comparativa entre os Ácidos Graxos das Microalgas	43.
5.4.5.1.	Saturados	43.
5.4.5.2.	Insaturados	43.
6.	CONCLUSÃO	45.
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	47.
8.	REFERÊNCIAS	48.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 – Rendimento de Extração de Óleo	02.
TABELA 2 – Composição do meio de cultura Conway utilizado nesta pesquisa...	23.
TABELA 3 – Composição do meio de cultura para <i>Arthrospira</i> utilizado nesta pesquisa.....	24.
TABELA 4 – Resultados da análise Cromatográfica do Óleo Extraído da Microalga <i>Arthrospira platensis</i>	36.
TABELA 5 – Resultados análise Cromatográfica do Óleo Extraído da Microalga <i>Chlorella sp.</i>	38.
TABELA 6 – Resultados da análise Cromatográfica do Óleo Extraído da Microalga <i>Entomoneis alata</i>	40.
TABELA 7 – Resultados do Cromatograma do Óleo Extraído da Microalga <i>Cylindrotheca closterium</i>	42.
TABELA 8 – Composição das amostras determinadas por CG.....	43.
TABELA 9 – Composição das amostras determinadas por CG.....	44.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 – Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) por um período de tempo.....	07.
FIGURA 2 – Tanques de cultivo de microalgas.....	12.
FIGURA 3 – Fotobiorreatores Utilizados para Cultivo de Microalgas.....	13.
FIGURA 4 – Esquema de Montagem para aeração dos cultivos.....	25.
FIGURA 5 – Curva de crescimento da <i>Arthrospira platensis</i>	29.
FIGURA 6 – Curva de crescimento da <i>Chorella sp</i>	29.
FIGURA 7 – Curva de crescimento da <i>Cylindrotheca Closterium</i>	30.
FIGURA 8 – pH do Cultivo da Microalga <i>Arthrospira platensis</i>	31.
FIGURA 9 - pH do Cultivo da Microalga <i>Chlorella sp</i>	32.
FIGURA 10 - pH do Cultivo da Microalga <i>Cylindrotheca Closterium</i>	32.
FIGURA 11 - Imagens das microalgas obtidas por microscópio Leica 12x20 – Grande Angular mantidas no banco de cultivo do LEA. a = <i>Entomoneis alata</i> (Ehrenberg) W. Smith, 1845, b = <i>Arthrospira platensis</i> (Nordstedt) Gomont,1892., c = <i>Nitzschia Closterium e</i> d= <i>Chlorella sp</i>	33.
FIGURA 12 – Cromatograma do Óleo extraído da Microalga <i>Arthrospira platensis</i> , no intervalo de 15,0 – 22,0 minutos.....	36.
FIGURA 13 – Cromatograma do Óleo Extraído da Microalga <i>Clrorella sp</i> no tempo de retenção de 15,0 – 17,0 min(A) e de 17,5 – 27,5 min (B).....	37.
FIGURA 14 – Cromatograma do Óleo Extraído da Microalga <i>Entomoneis alata</i> (Ehrenberg) W. Smith, 1845 até o tempo de retenção de 12,5 – 16,0 min (A) e de 17,5 – 27,5 min (B).....	39b
	0.
FIGURA 15 – Cromatogramas do Óleo Extraído da Microalga <i>Cylindrotheca closterium</i> até o tempo de retenção de 12,5 – 16,0 min (A) e de 17,5 – 27,5 min (B).....	41.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintéticos (providos de clorofila, portanto com capacidade de produzir oxigênio) que vivem na água ou em locais úmidos, trata-se de um grupo onde existe uma grande diversidade de organismos, no que diz respeito à morfologia, complexidade celular e tamanho.

Uma das características mais marcantes das microalgas é a sua ampla variedade com mais de 100 mil espécies, de formas, tamanhos e cores variadas, e seu crescimento de baixo impacto ambiental. Estes organismos podem se desenvolver facilmente em condições que contenham apenas luz solar e dióxido de carbono (CO₂) (REVISTA BIODIESEL, 2009).

As microalgas apresentam relevante potencial econômico, uma vez que muitas delas produzem substâncias industrialmente importantes, sendo ainda uma fonte de recursos pouco explorada pela humanidade (LOURENÇO, 1996). Quando tratadas em condições adequadas, as microalgas podem crescer massivamente. Também constituem uma importante fonte de alimento para humanos e animais, além de servirem de matérias-primas para produção de corantes naturais e outros compostos bioativos.

De modo geral, o estudo bioquímico destes microrganismos teve início na década de 1950 com a publicação do trabalho de Burlew (1953) sobre o conteúdo de proteínas de diversas espécies de microalgas. Posteriormente, em 1980, SHELF e SOEDER, estudaram diversos tipos de usos de microalgas.

De acordo com Lourenço (2006), em cinco anos haverá empresas que poderão produzir biodiesel a partir de microalgas já em larga escala. Do ponto de vista ambiental, o biodiesel de microalgas apresenta como vantagem grande disponibilidade de espécies e a baixa emissão de gases promotores do efeito estufa, na atmosfera.

As microalgas tem a facilidade de manipular lipídios em termos qualitativos e quantitativos, possibilitando a utilização de áreas com solos degradados, uso de água salobra no meio de cultivo, a qual é composta por sais simples, o meio de cultura pode ser reciclado. Maior assimilação de CO₂ e capacidade fotossintética do que vegetais superiores, com possibilidade de obtenção de créditos de carbono e produção contínua não segue regime de safra e a colheita é diária.

No Brasil, o cultivo de microalgas poderá vir a ser uma prática sócio-econômica muito promissora devido as suas condições climáticas adequadas, com temperaturas amenas em grande parte do ano e fontes hídricas abundantes. Assim, o domínio das técnicas de produção de concentrados de microalgas poderá abrir um novo campo de investigações sobre compostos bioativos voltados a indústria de corantes naturais, como a ficoeretrina e a ficocianina. Ainda, desde que muitas microalgas têm elevado valor nutricional, elevada produtividade de biomassa, baixas taxas de subsídios químicos e energéticos e reduzida demanda por área de cultivo, sua produção em escala industrial é promissora na geração de benefícios na áreas social, ambiental e econômico (BARROS, 2010).

Diferentes estudos realizados mostram que as microalgas possuem o mais elevado teor de matéria graxa, tornando-se uma excelente alternativa para a produção de biocombustíveis – devido à sua elevada densidade de lipídios comparando com as oleaginosas tais como canola, soja, palma, girassol etc. Dessa forma, a produção de microalgas poderia, promover um aumento na produção de óleo por hectare e reduzir o custo de produção de biodiesel, conforme mostra a **Tabela 1** (PEREZ, 2007).

Tabela 1. Rendimento de extração de óleo.

Rendimento de óleo t/ha ano	
Mamoma	0,5 – 1,0
Soja	0,2 – 0,6
Girassol	0,5 – 1,5
Canola	0,5 – 0,9
Pinhão manso	2,0 – 3,0
Óleo de palma(dendê)	3,0 – 6,0
Microalgas	50 – 150

Na Tabela 1 pode-se observar que as microalgas poderiam, teoricamente, produzir até 150 toneladas de óleo por hectare/ano. Comparando-as com a oleaginosa de maior rendimento em óleo, como a palma, o fator de vantagem é de 25 vezes, quando as microalgas são cultivadas em piscinas ou lagoas abertas.

Dentre as novas matérias-primas usadas na obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel, as microalgas emergiram como uma das fontes mais promissoras, por duas razões principais:

- a) O rendimento em óleo das microalgas é muito mais alto do que o melhor rendimento obtido com as oleaginosas tradicionais;
- b) As microalgas podem crescer em outros lugares que não sejam terras agrícolas e florestas, minimizando assim os danos causados aos ecossistemas e à produção de alimentos.

As microalgas cultivadas em meio aquoso e alimentadas com ar enriquecido de CO₂ produzem óleo, que depois pode ser convertido em biodiesel. Tal aproximação contribui para resolver dois problemas-chave; a poluição de ar resultante das emissões de CO₂ e crises futuras por falta de fontes de energia.

Estudos mostram que a produção por acre anual de óleo de microalga pode atingir 100 galões, dependendo do tipo de microalga usada, do modelo de cultivo do método de extração do produto. Desta forma, por exemplo, uma usina de biodiesel de microalgas poderia produzir até 10.000.000 de galões de combustível em apenas um ano (REVISTA BIODIESEL, 2009).

As microalgas têm uma grande capacidade de geração energética, apresentando significantes teores de lipídios em sua biomassa (20 a 80%), superando as melhores plantas oleaginosas. Tais lipídios são ricos em ácidos graxos Palmítico (C16:0) e Estereáico (C18:0), no entanto, a produção do biodiesel de microalgas ainda apresenta alto custo do processamento.

Pelo fato de o biodiesel ser uma fonte de energia renovável e possuir características vantajosas em relação a outras fontes, órgãos públicos e privados estão apoiando programas de pesquisa, bem como, reduzindo custos fiscais para produção industrial de matérias-primas para produção de biodiesel. As microalgas apresentam vários fatores favoráveis ao seu cultivo, com alta eficiência fotossintética em comparação com outras plantas vasculares, com reprodução muito elevada e viável utilização de águas residuais para o seu cultivo.

Outro ponto de grande destaque nos estudos atuais das microalgas, e que tem relação direta com os objetivos deste trabalho, é o cultivo de espécies locais visando à

produção de biomassa para extração do óleo e produção de biodiesel. Devido ao crescimento do interesse mundial no biodiesel como alternativa ao óleo diesel de origem fóssil, há no Brasil, atualmente, um grande número de projetos que vem sendo desenvolvidos com plantas oleaginosas para produção de matéria-prima para produção de biodiesel (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). O aumento da produção destas plantas tem conseqüências ambientais severas, visto que a expansão dessa nova prática agrícola implica mudanças nos padrões de uso do solo e conversões de áreas naturais. É neste ponto que se encaixam as microalgas, pois elas possuem maior rendimento em óleos quando comparadas com outras oleaginosas, o que resultaria em maior produção de óleo por hectare, otimizando assim o uso de pequenos espaços que poderia fornecer muito mais biomassa e mais biodiesel por unidade de área do que as plantas oleaginosas.

Há uma série de possibilidades de cultivo de microalgas para a produção de biodiesel, mas todas as opções estão limitadas a ambientes aquosos. Assim, é necessário separar a biomassa do meio para extração do óleo e para a transesterificação. Contudo, o processo de separação consiste em um procedimento trabalhoso, isso devido ao tamanho reduzido das células.

Os óleos são compostos por triacilglicerídeos (TAG) que são ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol. A identificação destes constituintes é simplificada por se basear apenas no número de átomos de carbono dos ácidos graxos. Assim, o uso de Cromatografia Gasosa Capilar a Altas Temperaturas (HT-CGC) em coluna polarizável ou apolar, possibilitou que um número maior de TAG fosse isolados cromatograficamente. Com o objetivo de elucidar o perfil lipídico de óleos de microalgas, o presente estudo tem como proposta investigar a composição triacilglicéridica do óleo de microalgas cultivadas por meio da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Este trabalho de pesquisa teve como objetivo realizar o cultivo em massa de microalgas em condições laboratoriais controladas e avaliar o potencial produtivo de óleos extraídos de microalgas por cromatografia gasosa.

2.2. *Objetivos Específicos*

1) Obter espécies de microalgas que sejam potenciais produtoras de biodiesel a partir de amostras coletadas;

2) Realizar cultivos laboratoriais em massa de espécies selecionadas mediante a utilização de tanques cultivos obtidos;

3) Crescimento desenvolvido do cultivo de espécies de microalgas, através das curvas de crescimento;

4) Obter biomassa de microalgas e avaliar técnicas de cultivo em massa de espécies potencialmente produtoras de lipídeos

5) Extrair óleo de microalga em escala laboratorial;

6) Determinar o perfil em ácidos graxos presente no óleo de microalga por cromatografia gasosa, visando a produção de biodiesel;

7) Realizar ensaios laboratoriais com o óleo produzido a partir da biomassa microalgal, visando a sua identificação.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. *Histórico do Cultivo de Microalgas*

O cultivo de microalgas em escala comercial foi iniciado em 1960 no Japão com o cultivo de *Chlorella sp* seguida no início de 1970 com o estabelecimento da *Arthrospira platensis* cultivada em larga escala no Lake Texcoco, México e em 1977 na Tailândia. Por volta de 1980 haviam 46 fábricas de larga escala na Ásia, produzindo mais de 1 T de microalgas por mês (principalmente *Chlorella*). A produção comercial de *Dunaliella salina*, como fonte de β -caroteno, pela Western Biotechnology Ltd e Betatene Ltd (hoje Cognis Nutrition & Health) tornou-a a terceira maior indústria de microalga desenvolvida na Austrália em 1986, seguidos de Israel e Estados Unidos da América (EUA). Mais recentemente, várias fábricas produzindo *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina foram estabelecidas no USA e Índia. Assim, em cerca de 30 anos, a indústria da biotecnologia de microalgas cresceu e se diversificou significativamente (LOURENÇO, 2006; SHELEF; SOEDER, 1980).

3.2. *Cultivo de Microalgas*

Existem vários métodos de cultivo de microalgas, o mais comumente utilizado é baseado na indução artificial de condições eutróficas que levam a um rápido desenvolvimento de explosões populacionais denominado, “*blooms*”. Este método consiste na adição de um inóculo puro de microalga a um meio de cultivo (LOURENÇO, 2006).

Como os demais microrganismos, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. A manipulação das condições de cultivo, a presença, ausência ou concentração de determinados nutrientes, tendem a estimular a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos e antioxidantes naturais, alguns de elevado valor comercial (HENRIQUES et al., 1998). Além de influenciar decisivamente os resultados de crescimento celular como também os componentes da biomassa e produtos de interesse como pigmentos, proteínas, lipídios, ácidos graxos, entre outros (DERNER, 2006).

3.3. Crescimento das Microalgas

Em condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas podem crescer profusamente. Comumente elas dobram a sua biomassa dentro de 24 h ou menos e durante a fase de crescimento exponencial elas podem completar um ciclo de vida dentro de 2 a 4 horas, conforme mostra a Figura 1 (Mata, 2007), onde são mostradas nas fases seguintes:

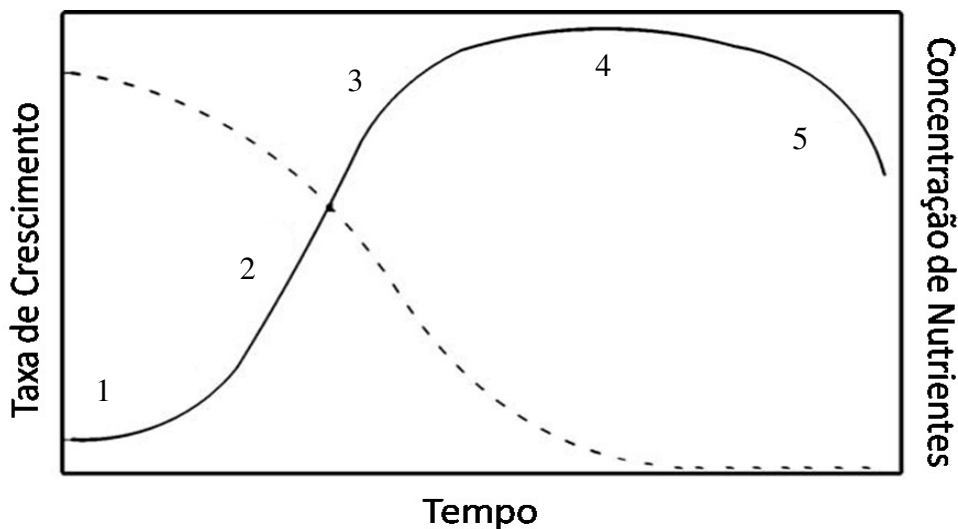


Figura 1. Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada em função de um período de tempo.

Fonte: Mata et al., (2010).

(1) Fase de Indução: ocorre logo após a inoculação da célula, sendo um período de adaptação onde não existe incremento populacional, podendo ocorrer redução na densidade celular, podendo, ainda, não acontecer ou ocorrer muito rapidamente;

(2) Fase Exponencial: caracterizada pelo crescimento logarítmico, nesta fase a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos de tempo regulares e a velocidade de crescimento alcança seu ritmo máximo;

(3) Fase de Diminuição do Crescimento Relativo: nesta fase acontece uma redução na taxa de crescimento celular, aumentando o tempo de duplicação, neste período a quantidade de nutrientes e a energia luminosa por célula (autossombreamento) já estão reduzidos devido ao incremento da densidade celular, diminuindo assim a atividade fotossintética;

(4) Fase Estacionária: caracterizada pela constância da densidade celular, a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade, ela pode ser caracterizada por pequenos acréscimos e decréscimos na população microalgal, mas ao ajustar a curva (regressão logística) esta fase é representada graficamente por uma reta;

(5) Fase de Morte da Cultura, que acontece devido ao esgotamento dos nutrientes (Figura 1) e ao autossombreamento, impossibilitando o crescimento (DERNER, 1995, 2004; DERNER et al., 2006).

3.4. Fatores Limitantes para o Crescimento Microalgal

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultante da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (MOHEIMANI, 2005). As respostas das células a essas condições ambientais definem esses fatores como limitantes ou otimizantes. Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas da espécie cultivada, a possível influência de outros organismos sobre o seu desenvolvimento e a idade do inóculo (PELIZER et al., 2003). Quanto aos fatores físico-químicos os mais observados são a luz (DARLEY, 1982), a temperatura (COLLA et al., 2007), quantidade e tipo de aeração (CONVERTI et al., 2006; ONCEL; SUKAN, 2007), a disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975), a salinidade (LOURENÇO et al., 2002) e o pH (LOURENÇO, 2006). Todos esses fatores podem influenciar nos teores de lipídeos das microalgas, incluindo a sua forma e tamanho, digestibilidade (relacionada à estrutura e composição da parede celular), composição bioquímica (nutrientes, enzimas, toxinas, se presentes) etc.

A influência da luz no desenvolvimento das microalgas está relacionada ao fotoperíodo (tempo de exposição à luz), intensidade. O fato de a luz variar tanto no espaço quanto no tempo, também é um fator condicionador ao seu crescimento (ABE; GALVÃO, 1991; DARLEY, 1982; DUBINSKY, 1990). A qualidade do espectro luminoso e a irradiação também podem causar efeitos diferenciados no crescimento celular, em especial, na composição bioquímica, principalmente quanto ao teor de proteínas, polissacarídeos e clorofila (RIVKIN, 1989). É devido à luminosidade que a fotossíntese ocorre, mas ela se processa até um limite denominado ponto de saturação luminosa, que é da ordem de 5 a 10

Klux para cianobactérias (MORIST et al., 2001). O cultivo sob altas intensidades luminosas é responsável por dois fenômenos prejudiciais: a foto-oxidação, que tem efeitos letais para as células, podendo levar à perda total da cultura e a fotoinibição, provocando um decréscimo no rendimento máximo do crescimento, esta também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas. (JENSEN; KNUTSEN, 1993; SAMUELSSON et al., 1985).

A temperatura é o fator restritivo mais importante, depois da luz, para o cultivo de microalgas, exercendo forte influência sobre as reações metabólicas e conseqüentemente sobre a taxa de crescimento. Os efeitos da temperatura em muitas espécies de microalgas cultivadas em laboratório são bem documentados, mas a magnitude de efeitos de temperatura na produção de biomassa anual ao ar livre ainda não é suficientemente conhecida. Muitas microalgas podem tolerar facilmente temperaturas de 8 a 15 °C mais baixo do que a sua temperatura ótima de crescimento, mas em temperaturas elevadas, aproximadamente 4 °C acima do ponto ótimo de crescimento pode resultar na perda total da cultura (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010).

Quanto à nutrição, as microalgas necessitam de uma série de nutrientes para um crescimento otimizado. As quantidades requeridas de nutrientes no meio variam entre as espécies e dependem de distintas condições ambientais (GUILLARD, 1975). Em geral, a composição do meio de cultura é uma simulação do meio natural no qual a espécie se encontra (ou o mais próximo deste), contendo vários sais minerais, elementos traço e algumas vezes vitaminas (cianocobalamina, tiamina e biotina), mas em baixas concentrações. Os nutrientes requeridos podem ser classificados em duas categorias: os macronutrientes, compostos por C, H, O₂, N₂, P, S, K, Mg, Si e Fe e os micronutrientes Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se e Ni (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

O controle do pH é essencial para que os componentes do meio de cultura possam ser efetivamente absorvidos, afetando diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos. O pH é fundamentalmente influenciado pelas proporções entre formas de carbono dissolvidas na água de cultivo, onde o consumo desse CO₂ afeta o crescimento de microalgas, aumentando o pH do sistema, que pode atingir níveis muito elevados (LOURENÇO, 2006).

A salinidade, tanto em sistemas abertos como fechados, pode afetar o crescimento e a composição da célula de microalgas. Cada alga tem uma concentração de salinidade ótima. Em cultivos abertos esta concentração pode variar de acordo com as condições do tempo, estando mais concentrado em dias quentes devido à evaporação (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010). Essa variação na salinidade, normalmente prejudica o crescimento da biomassa em virtude do estresse osmótico e iônico e das modificações nas proporções iônicas celulares devido à permeabilidade seletiva da membrana aos íons (BRAND 1984; GLASS, 1983).

A movimentação e aeração também são parâmetros importantes de crescimento, já que estes proporcionam a homogeneização da distribuição de células, do calor, e dos metabólitos, facilitam a transferência de gases, previnem a sedimentação e ajudam para um melhor contato entre as células e os nutrientes. O grau de agitação deve ser investigado para evitar o declínio na produtividade e o rompimento de tricomas. A agitação também garante a eliminação de oxigênio supersaturado (LITCHFIELD, 1977; RICHMOND, 1983).

3.5. Meio de Cultivo

Assim como as plantas, as microalgas requerem três componentes para crescer: luz solar, CO₂ e água. A fotossíntese é um processo bioquímico através do qual as plantas, as microalgas e alguns tipos de bactérias convertem a energia fornecida pela luz solar em energia química. Esta energia é utilizada em reações que levam à formação dos açúcares ou à fixação do nitrogênio nos aminoácidos (os compostos fundamentais para a síntese das proteínas).

Estes organismos podem ser cultivados em diversos sistemas de produção, com seu volume variando desde poucos litros até bilhões deles. Os sistemas de cultivos comumente empregados são simples, isso por serem a céu aberto, sob condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle sobre esses parâmetros físicos.

Um grande problema no cultivo de microalgas em piscinas ou lagoas abertas é que as espécies com conteúdo mais elevado de óleo não são necessariamente as mais rápidas para se reproduzir. A espécie de microalga indesejável que contamina a cultura de

microalga específica é outro dos problemas mais significativos na microalga-cultura, com a possível exceção da *Spirulina* (que cresce em um meio agressivo e em um pH extremamente elevado, eliminando desse modo a possibilidade da contaminação por outras espécies (BARROS, 2010).

Para o desenvolvimento e produtividade das microalgas é primordial o conhecimento dos nutrientes necessários para o seu cultivo que devem complementar suas necessidades nutricionais. Entre as espécies, ocorrem variações desses nutrientes tanto em relação à quantidade, quanto aos que devem ser utilizados, podendo, os diferentes tipos de meios de cultura, serem adequados a vários grupos de microalgas, para somente alguns deles ou apenas para determinadas espécies. Ainda assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais (GUILLARD, 1975).

De acordo com Lourenço (2006), diversos experimentos laboratoriais foram iniciados desde o primeiro quarto do século XX para definir a importância relativa de cada substância essencial para a nutrição das microalgas, mas ainda não foi consolidado um número universal e exato desses elementos, devido ao fato de que certos elementos são essenciais para determinadas espécies ou grupos taxonômicos e para outros não. Reconhece-se um conjunto de 15 a 21 elementos considerados essenciais para o desenvolvimento e composição química das microalgas, divididos em macronutrientes e micronutrientes.

3.6. *Sistemas de Cultivo*

O cultivo de microalgas compreende formas simples e convencionais de produção de biomassa algácea em certas aplicações, mas podem envolver também processos e equipamentos mais complexos, caracterizando a atividade como um dos mais modernos processos da biotecnologia. A escolha do tipo do cultivo depende dos produtos de interesse (biomassa, ácidos graxos, pigmentos, etc.) que as microalgas podem sintetizar naquelas condições determinadas. Com melhoria do processo de cultura é possível produzir alimentos e vários produtos de interesse nutricional, farmacológico e industrial, a custos, às vezes, muito inferiores aos da agricultura tradicional e numa velocidade de produção muito maior.

Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamentos específicos, denominados fotobioreatores, nos quais é possível controlar os parâmetros

ambientais, o que eleva a produtividade, a qual viabiliza a produção comercial de compostos de elevado valor comercial (TREDICI, 2004).

Os sistemas de cultivo aberto (Figura 2) normalmente são mais fáceis de construir e de funcionamento mais simples, são duráveis e tem uma grande capacidade de produção quando comparados com os sistemas de reatores fechados. Contudo, os tanques usam mais energia elétrica para homogeneizar os nutrientes e movimentar as células, permitindo que as microalgas recebam bastante energia solar necessária para seu crescimento. Os materiais utilizados para construir as paredes e o fundo de um tanque aberto podem variar de areia simples ou barro, a tijolos ou cimento, ou cloreto de polivinilo, fibra de vidro ou poliuretano. Os tanques abertos são relativamente econômicos e fáceis de limpar depois do cultivo. (RICHMOND, 2004; DERNER et al., 2006).



Figura 2. Tanques de cultivo de microalgas.

Fonte: Jornal Tamanduá (2005), Parry Nutraceuticals (2006).

Os tanques abertos estão sujeitos as condições ambientais, não permitindo controle de temperatura, evaporação e iluminação. Podem produzir grandes quantidades de microalgas, mas ocupam uma área mais extensa que os fotobioreatores e o índice de contaminação biológica (protozoários, bactérias, outras microalgas) é elevado (MOHEIMANI, 2005; RICHMOND, 2004; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

Fotobiorreator (Figura 3) é um reator no qual organismos que necessita de luz para se desenvolver são cultivados ou usados para executar uma reação fotobiológica. São sistemas flexíveis que podem ser otimizados segundo as características biológicas e

fisiológicas da espécie algácea cultivada (MOHEIMANI, 2005). Dependendo da sua forma ou desenho, considera-se que os fotobioreatores apresentam várias vantagens sobre tanques abertos, visto que, oferecem melhor controle das condições de cultivo e parâmetros de crescimento (pH, temperatura, agitação), previne a evaporação, reduz perdas de CO₂, oferece um ambiente mais seguro e protegido, minimiza ou previne a contaminação por microrganismos competidores (RICHMOND, 2004).



Figura 3 Fotobioreatores utilizados para o cultivo de microalgas.
Fonte: World (2008).

As limitações principais do fotobioreator incluem: o superaquecimento, entupimento, a acumulação de oxigênio, o alto preço de instalação, funcionamento e manutenção do cultivo da biomassa algácea. O custo da produção de biomassa em fotobioreator pode ser maior do que em tanques. Apesar dos sistemas fechados não oferecerem vantagens quanto a produtividade por área, eles basicamente sobrepujam tanques quanto a produtividade volumétrica (8 vezes mais alto) e a concentração celular (aproximadamente 16 vezes mais alto) (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; MOHEIMANI, 2005).

3.7. Medidas de Crescimento das Microalgas

Em cultivos de microalgas e de outros microrganismos, podem ser aplicados determinados parâmetros de crescimento (empregando fórmulas) e representações gráficas para avaliar o desenvolvimento das culturas (VONSHAK, 1990). O crescimento de uma

população microalgal pode ser estimado pelo emprego de determinados parâmetros, dentre os quais podem ser destacados a densidade celular máxima, a velocidade (taxa) de crescimento e o tempo de cultivo. Esses parâmetros podem ser determinados a partir do cultivo pela contagem direta por microscopia (quantificar o número de células algáceas por mililitro de cultivo), fluorescência “in vivo” e densidade óptica.

De acordo com Oliveira, (1993), a densidade celular máxima é o maior valor obtido em número de células por mililitro, já a velocidade de crescimento representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (divisões por dia). O tempo de cultivo é o período transcorrido entre o início do cultivo e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima ou que a biomassa apresentou o maior conteúdo de um determinado composto de interesse ou, ainda, alcançou o maior valor nutricional para a espécie de organismo que se quer alimentar no menor espaço de tempo possível. Esse último parâmetro de avaliação do crescimento é considerado muito importante em se tratando de cultivos em grande escala, uma vez que o tempo é decisivo para a escolha de uma determinada espécie, do seu processo de produção e da infraestrutura necessária para o seu cultivo (BROWN et al. 1997; TREDICI, 2004).

De acordo com BROWN et al. (1997), a composição nutricional das microalgas pode variar também em função de diferentes condições de cultivo e da fase de crescimento da cultura. Para avaliar o desenvolvimento de microalgas, é essencial que o crescimento da população em cultivo seja acompanhado para determinar o momento adequado para a sua colheita e utilização.

3.8. Densidade Óptica

O uso da densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas fundamenta-se na obstrução física da luz pelas células. Quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz (absorvância) e menor será a transmitância (passagem de luz pela amostra). Nessas medições utiliza-se o espectrofotômetro para realizar as medições, que idealmente devem ser em intervalos de tempo bem controlados.

Uma vez que as microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, convém selecionar comprimentos de onda que não correspondam ao pico de absorção de luz pelos

pigmentos. Por exemplo, 570 nm, que se situa numa faixa distante da absorção máxima de luz pelas clorofilas e pelos carotenóides. Assim, a absorvância registrada será pouco influenciada pelos pigmentos fotossintéticos, sendo atribuída, fundamentalmente, à obstrução física da passagem de luz pelas células em suspensão (LOURENÇO, 2006).

3.9. Macronutrientes

Nas microalgas, os macronutrientes são responsáveis por várias funções como fontes de constituintes estruturais das biomoléculas, da membrana e do meio intracelular, participação nos processos de troca de energia e regulação das atividades metabólicas. A sua ausência ou insuficiência pode comprometer algumas das funções vitais nesses microrganismos (LOURENÇO, 2006):

- Carbono (C): componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteína, carboidrato, lipídeo, vitaminas, etc.). São fontes de carbono a difusão natural de CO₂ do ar atmosférico para o meio de cultivo, adição de sais de carbonatos ou bicarbonatos;
- Hidrogênio (H): apesar de sua grande abundância nas microalgas, não é um fator limitante. Pode ser adquirido pela quebra das moléculas de água por meio da fotólise da água (reação primária da fotossíntese), fator que garante sempre uma elevada concentração deste elemento no meio;
- Oxigênio (O₂): necessário para a respiração e os processos que necessitem de energia, mas não exerce efeito limitante;
- Nitrogênio (N₂): componente básico na formação de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes, constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário e pode ser encontrado em concentrações variáveis no interior das células algáceas na forma inorgânica (nitrito, nitrato e amônio). É assimilado, preferencialmente, sob forma amoniacal (NH₃ e NH₄⁺), mas também podem ser assimiladas na forma de nitrogênio gasoso ou molecular (algumas cianobactérias), de nitrato (NO₃⁻), de nitrito (NO₂⁻). As principais fontes são os sais de nitrato, sais de amônio e uréia. As concentrações de proteínas e clorofilas nas células são diretamente proporcionais ao suprimento de nitrogênio, com isso, a

diminuição da concentração de proteína, ocasiona aumento significativo no percentual de polissacarídeos e a diminuição da clorofila aumenta a concentração de carotenóides gerando mudança de coloração no cultivo que tendem ao aspecto amarelado;

- Fósforo (P): assim como o nitrogênio o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes para as microalgas. Ele é importante na regulação do metabolismo celular (síntese de lipídeos e carboidratos) e no fornecimento de fosfatos para a geração de energia e na constituição de moléculas estruturais (ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas). O fósforo é assimilado na forma de ortofosfato (HPO_4^{3-}). As microalgas são capazes de absorver quantidades elevadas do fósforo (8 a 16 vezes a mais que a sua cota mínima), isso permite que a célula continue a se desenvolver mesmo que não haja disponibilidade de novas fontes deste elemento. A absorção do fósforo é inibida total ou parcialmente pelo arsênio. Geralmente as fontes do fosfato são os sais de sódio e potássio;

- Enxofre (S): o enxofre representa 1 a 2% do peso seco celular e a maior parte dele se encontra presente na constituição dos aminoácidos metionina e cisteína, mas também está presente como co-fator de enzimas e em certas vitaminas tais como biotina e tiamina;

- Potássio (K): é regulador da pressão osmótica, estimula a respiração em pH reduzido, é co-fator de várias enzimas e na conformação e estabilidade de proteínas;

- Magnésio (Mg): elemento essencial para as microalgas por ser constituinte da molécula de clorofila. O magnésio é co-fator de várias enzimas, participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimula a síntese de ácidos graxos essenciais, regula os níveis iônicos celulares. Quando há deficiência, ocorre a perda do conteúdo pigmentar da célula, denominado clorose;

- Silício (Si): apenas as diatomáceas e silicoflagelados necessitam do silício, pois é componente estrutural das frústulas e esqueleto externo respectivamente. São fontes de silício os sais de silicato de sódio hidratados (LOURENÇO, 2006).

3.10. Micronutrientes

O principal papel dos micronutrientes, em especial os metálicos, é participar da estrutura e da atividade de diversas enzimas que são envolvidas nas diversas vias metabólicas, conferindo diferentes papéis para cada um deles. Alguns micronutrientes metálicos podem ser tóxicos para as microalgas se estiverem em altas concentrações e podem também atuar como antagonistas, provocando deficiência em determinados nutrientes mesmo que ele esteja disponível no meio (LOURENÇO, 2006):

- Ferro (Fe): extremamente importante para as algas. Participa de funções como respiração, fotossíntese, da via biossintética da clorofila e do citocromo, reduz o sulfato, o nitrato e o nitrito, fixa o nitrogênio molecular e é co-fator de diversas enzimas;
- Manganês (Mn): componente estrutural dos tilacóides, dos cloroplastos e da superóxido-dismutase (enzima que remove radicais superóxidos tóxicos das células) e funciona como um co-fator de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos e do ciclo de Krebs. É exigido pelas algas em concentrações mais baixas que o ferro. Nos meios de cultura está disponível como cloreto de manganês quelado;
- Molibidênio (Mo): sua principal função é associada ao metabolismo do nitrogênio por ser um constituinte da nitrato redutase, enzima responsável pela redução do nitrato em nitrito. Este elemento é co-fator de enzimas que participam da respiração, fotossíntese e da nitrogenase (fixação de N_2 nas cianobactérias). As microalgas necessitam de uma baixa demanda, sua razão com carbono (Mo:C) é de 0,27 μmol : 1 mol. Normalmente é ofertado na forma de molibdato de sódio;
- Cobalto (Co): componente fundamental da cianocobalamina, vitamina essa essencial para o desenvolvimento das algas em geral. Está envolvido no metabolismo do nitrogênio e é exigido em pequenas concentrações. Em meios de cultivo, geralmente é oferecido na forma de cloreto de cobalto;
- Boro (B): elemento limitante essencial para as diatomáceas, clorofíceas, cocolitoforídeos e constitui antibióticos produzidos pelas microalgas. Algumas funções do boro para as algas ainda não foram bem elucidadas, mas

especula-se que o elemento participa na regulação da utilização do carbono e apresenta algum papel relevante na estrutura dos ribossomos. É fornecido no meio de cultura como ácido bórico (H_3BO_3);

- Vanádio (V): elemento-traço componente das enzimas haloperoxidases, participando assim da formação de vasta gama de produtos naturais que contém halogênios em algas. Somente alguns meios de cultura adicionam o vanádio, mas em concentrações extremamente baixas. É oferecido na forma de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4);

- Zinco (Zn): assemelha-se aos papéis metabólicos do manganês. É componente estrutural da anidrase carbônica (transporte e fixação de CO_2), de enzimas envolvidas na transcrição do DNA e da fosfatase alcalina. Em meios de cultura, geralmente, deve ser adicionado na forma de sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$);

- Cobre (Cu): constituinte fundamental de coenzimas que participam do transporte de elétrons na fotossíntese, como a citocromo oxidase, sendo necessário para a aquisição de energia pela alga. Deve ser adicionado em meios de cultura como cloreto de cobre ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) ou sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$);

- Selênio (Se): elemento essencial para o crescimento de microalgas. Ocorre na glutathione peroxidase, enzima responsável por degradar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos (LOURENÇO, 2006).

3.11. Vitaminas

Apenas três vitaminas são efetivamente importantes para as microalgas: tiamina, biotina e cianocobalamina. Algumas espécies podem sintetizá-las, as que não sintetizam necessitam recebê-las de fontes exógenas. As demais vitaminas não atuam como fatores limitantes, pois: (a) são sintetizadas pelas algas, (b) são sintetizadas por microrganismos associados a algas e disponibilizados, (c) não apresentam funções biológicas para algas, (d) ou são necessárias em concentrações tão baixas ao ponto de serem irrelevantes (LOURENÇO, 2006).

3.12. Quelantes

Alguns dos elementos metálicos importantes para a nutrição das microalgas não são solúveis, eles necessitam interagir com outras substâncias para serem solubilizados. Atualmente, o Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) é a principal substância empregada em meios de cultura como quelante, sendo utilizada na forma mais solúvel apresentada pelo sal dissódico ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (LOURENÇO, 2006).

4. EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido no Campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sendo que o cultivo das microalgas foi executado na Unidade de Microplâncton e Cultivo de Microalgas do Laboratório de Estudos Ambientais (LEA/CCEN/UFPB).

4.1. Meio para o Cultivo

Os meios padrão para cultivo das microalgas foram o de meio ZARROUK, (1966) para a *Arthrospira platensis* e o meio Conway, para as microalgas *Entomoneis alata*, *Chlorella sp* e *Cylindrotheca Closterium*, cuja principal característica é fornecer entre outros nutrientes, carbono inorgânico introduzidos sob as formas de NaHCO_3 e Na_2CO_3 que se convertem em CO_2 utilizado na fotossíntese (VONSHAK, 1997).

4.2. Condições de Cultivo

Os cultivos das microalgas *Arthrospira platensis*, *Entomoneis alata*, *Chlorella sp* e *Cylindrotheca Closterium* em tanque de cultivo contínuo foram desenvolvidos na Unidade de Microplâncton e Cultivo de Microalgas do LEA. Os cultivos foram realizados em ambiente climatizado com temperatura de 28 ± 3 °C, sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes 40W ($4,5 \pm 0,3$ Klux) tipo luz-do-dia e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, controlado por fotocélula externa. A agitação foi realizada pela injeção contínua de ar num fluxo de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ por compressor. Estas espécies, quando cultivadas em meio líquido e com agitação constante, apresentam células individualizadas de coloração verde-azulada.

4.3. Curvas de Crescimento das Microalgas

As curvas de crescimento das espécies foram acompanhadas por contagem celular em câmaras Sedgewick-Rafter em microscópio binocular Leica. Esses procedimentos foram realizados diariamente, a cada 24 horas, a partir da fase de

inoculação da cepa no meio de cultura. Os cultivos foram inoculados com densidade celular inicial de aproximadamente $3,0 \times 10^2$ cel mL⁻¹.

4.4. Obtenção e Manutenção das Culturas

As cepas das microalgas foram obtidas no banco de cultura do Laboratório de Estudos Ambientais da UFPB, coletadas pelo Prof. Dr. Roberto Sassi.

Foram realizadas coletas de microalgas em diferentes mananciais do estado da Paraíba (rios, riachos e nascentes, estuários e ambiente marinho), localizados no litoral paraibano.

O material foi coletado em frascos de vidro transparente e transportado ao laboratório em condições herméticas. Procedeu-se a inoculação de gotas desse material em tubos de ensaio estéril contendo meios de cultura, os quais foram mantidos em câmaras de germinação dotadas de sistema de iluminação e controle de fotoperíodo.

O isolamento e a purificação das culturas foram efetuados empregando-se micropipetas capilar. O método consiste em isolar individualmente cada uma das espécies que cresceram a partir do inoculo com população mista e re-inocular um único exemplar em tubos de ensaio estéril separadamente contendo meio de cultura. Os tubos assim preparados foram mantidos em câmara de cultivo dotada de sistema de iluminação com fotoperíodo controlado e temperatura constante.

As culturas unialgais obtidas foram mantidas em balões de 250 mL com 150 mL de meio de cultura ou em tubos de ensaio. As repicagens foram sempre feitas na fase exponencial, evitando-se assim possíveis contaminações. Os clones re-inoculados foram mantidos em câmara climatizada localizado no Laboratório de Estudos Ambientais (LEA-UFPB).

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas amostras de microalgas coletadas (*Chlorella sp*, *Entomoneis alata* e *Cylindrotheca closterium*) e espécie já existente. Cada uma dessas espécies de microalgas teve sua curva de crescimento determinada, com o intuito de definir adequadamente os momentos de repicagens.

Todos os materiais utilizados na manutenção dos cultivos e nos experimentos foram criteriosamente esterelizados, a fim de evitar possíveis contaminações cruzadas. Para tanto, a limpeza do material foi realizada com detergente neutro a 10%,

carbonato de sódio (Na_2CO_3) e solução aquosa de ácido clorídrico 5%, com enxágües sucessivos em água corrente, conforme MILLER e COLMAN, (1980). Por fim, estes foram secos em estufa à 40°C, e, em seguida, esterilizado em autoclave a 120°C, por 30 min, conforme rotina do laboratório de cultivo de microalgas do LEA. Materiais específicos como tubos de látex, conectores e papéis, foram esterilizados em câmara UV.

4.5. Preparação dos Meios de Cultura

Os meios sintéticos usados para a manutenção dos cultivos foram preparados usando água do mar filtrada para a *Entemoneis Alata* e a *Cylindrotheca closterium* a 120 °C por 30 min. Tal água foi deixada em repouso por 24 horas em temperatura ambiente sendo então, adicionados as vitaminas, os macro e micronutrientes, conforme especificado nos Quadros 1 e 2. Foi utilizado o meio Zarrouk para o cultivo da *Arthrospira platensis*, e o meio Conway para os cultivos com *Chlorella sp*, *Entomoneis alata* e *Cylindrotheca closterium*.

TABELA 2. Composição do meio de cultura Conway utilizado nesta Pesquisa.

Solução Principal	Quantidades
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,60 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,72 g
H ₃ BO ₃	67,20 g
EDTA	90,0 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	40,0 g
NaNO ₃	200,0 g
Solução de metais traços	2,0 mL
Água destilada	2.000 mL
Adicionar 1,0 mL para cada litro de água do mar	
Solução de vitaminas	Quantidades
B12	10,0 mg
B1	200,0 mg
Água destilada	200,0 mL
Adicionar 0,1mL para cada litro de água do mar	
Solução de metais	Quantidades
ZnCl ₂	2,1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,9 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0 g
Água destilada	100,0 mL
Adicionar a Solução Principal	
Solução de silicato	Quantidades
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	4,0 g
Água destilada	100,0 mL
Adicionar 2,0 mL para cada litro de água do mar em caso de cultivo de diatômaceas e de silicoflagelados	

Fonte: WALNE (1966).

Tabela 3. Composição do Meio de Cultura para *Arthrospira* Utilizado nesta Pesquisa.

Solução de Trabalho	Quantidades
KNO ₃	15,0 g em 200 mL
NaCl	33,0 g em 200 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,50 g em 200 mL
K ₂ HPO ₄	1,50 g em 200 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,58 g em 200 mL
Na ₂ EDTA	6,40 g em 100 mL
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,50 g em 100 mL
H ₃ BO ₃	1,142 g em 100 mL
Solução mista	*
*Solução mista	Quantidades
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,049 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,144 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,882 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0157 g
MoO ₃	0,071 g
Água destilada	100 mL
Preparação de 1,0 litro de meio de cultura (água destilada)	
A - Dissolver em 600 ml de água destilada 15,0 g de NaHCO ₃ e 2,0 g de Na ₂ CO ₃ .	
B - Acrescentar 10,0 ml das soluções 1, 2, 3, 4 e 5.	
C - Acrescentar 1,0 ml das soluções 6, 7, 8 e 9.	
D - Completar o volume a 1.000 ml.	

Fonte: Zarrouk, (1966).

4.6. Obtenção de Biomassa Seca

Inicialmente, a cepa da microalga foi acondicionada na câmara de cultura de microalgas do LEA/UFPB em condições pré-estabelecidas, mas sem aeração. O cultivo foi iniciado adicionando-se 1,0 mL da cepa da microalga em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura correspondente. Após sete dias adicionou-se os 100 mL do concentrado algáceo a 400 mL de meio de cultivo. Passados cinco dias, quando a biomassa já estava densa, o volume total do concentrado algáceo obtido foi transferido 320 L, para o meio de cultivo em caixas brasilit com capacidade para 500 L. O esquema da montagem para aeração dos cultivos encontra-se na Figura 4.

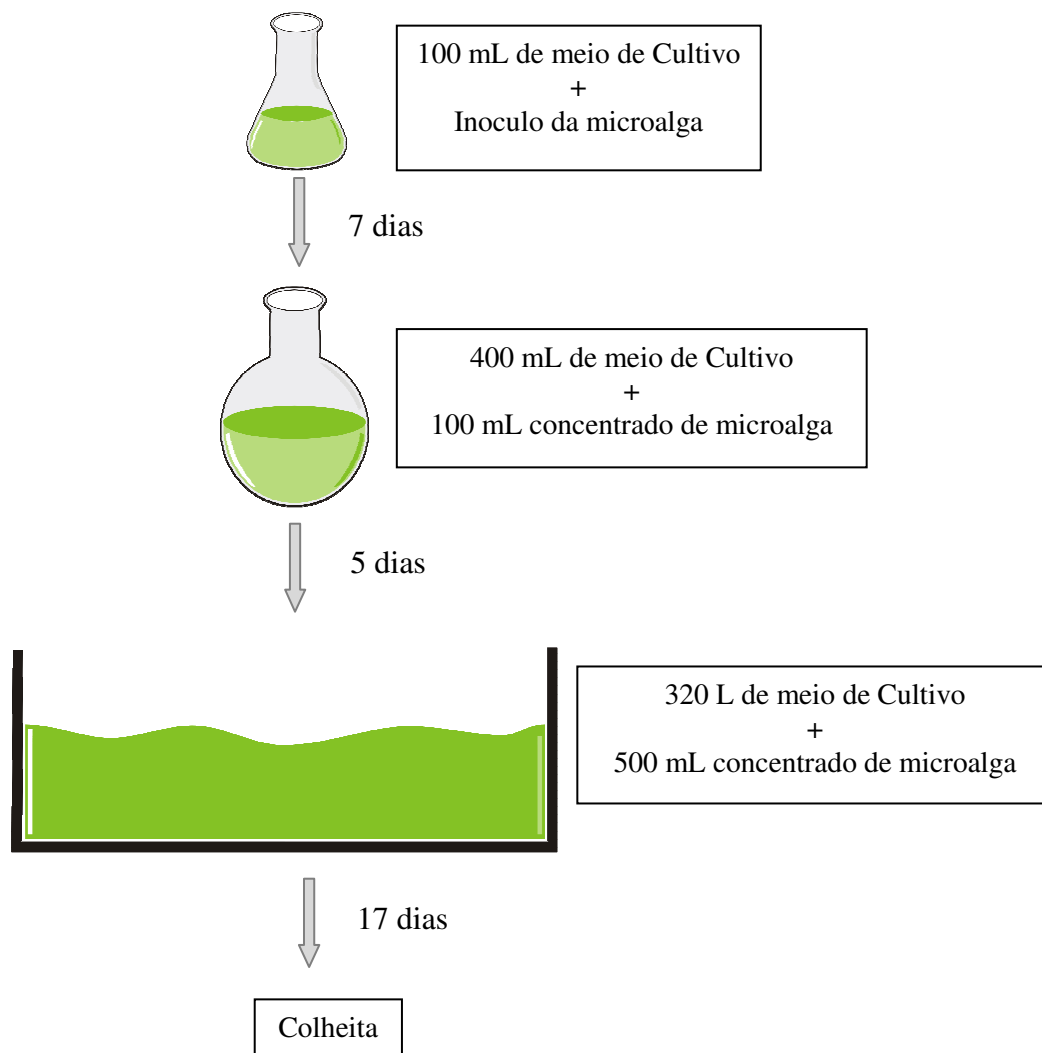


Figura 4. Esquema da montagem para aeração dos cultivos.

4.7. Colheita e Filtração

Quando os cultivos atingiram o final, a biomassa da *Arthisprora platensis* foi filtrada por gravidade (filtração direta) em tela de nylon com abertura de malhas de 20 µm, seguida de prensagem conforme metodologia desenvolvida por BARROS e SASSI, (2007); e a biomassa da *Chlorella* sp, *Entomoneis alata* e *Cylindrotheca closterium*, foi deixada decantar por um período de 4 horas e material recolhido através de sucção, sendo este centrifugado e o sobrenadante descartado.

4.8. Métodos de Secagem

A biomassa microalgal obtida foi submetida à liofilização sendo o material congelado a uma temperatura de aproximadamente -40 °C por 8 horas. Em seguida, o material foi levado ao liofilizador por um período de 24 horas. A liofilização foi realizada a uma temperatura de -40 °C, pressão de 0,0966 mmHg e percentual de vácuo de 99,99 em Liofilizador Terroni modelo LS3000. Após a liofilização, a biomassa é convertida em um pó solto e uniforme, após maceração.

4.9. Extração do Óleo das Microalgas

A extração do óleo das microalgas foi realizada em um aparelho de Soxhlet usando 500 mL de hexano como solvente, 26 g da biomassa de todas as microalgas seca, foi colocado em um tubo de vidro e em seguida no extrator, que foi conectado a um balão de 500 mL. O solvente foi adicionado e o condensador foi conectado ao extrator. O aquecimento foi controlado por um termostato ligado a uma manta aquecedora.

O óleo das microalgas foi obtido após oito horas de extração, caracterizada pela mudança de cor (amarela) do solvente. Em seguida, foi retirado o excesso de solvente com gás nitrogênio e colocado em um recipiente de vidro.

4.10. Determinação Cromatográfica dos Triacilglicerídeos (TAG) em Microalgas

As análises cromatográficas dos TAG foram realizadas no Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES), do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, UFG, em um cromatógrafo a gás CG-MS 17A, tendo como gás de arraste o hélio, equipado com um detector de espectro de massa, injetor split = 1:10, com velocidade linear média do gás de 40 cm.s^{-1} , e uma temperatura de $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Foi utilizada uma coluna LM -100 carbowax (polietilenoglicol) $25 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,3 \text{ }\mu\text{m}$. Empregou-se uma temperatura inicial de 70°C a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 240°C 13min) e depois 5°C min^{-1} até 250°C , temperatura do injetor/interface a 250°C .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Curvas de Crescimento das Microalgas*

As curvas de crescimento obtidas para as espécies *Chlorella sp*, *Cylindrotheca closterium* e *Arthrospira platensis* mostraram comportamentos distintos, tanto no que concerne à duração da fase Lag, no número máximo de células na fase estacionária, na duração da fase exponencial e no rendimento máximo em biomassa. O crescimento mais rápido foi registrado com a clorofícea *Chlorella sp*, seguido pela diatomácea *Cylindrotheca closterium* onde as maiores densidades celulares foram registradas, contrastando com a cianobactéria *Arthrospira platensis*, cujo número de células ao final do experimento foi bem menor. Tais diferenças certamente estão associadas com o tamanho das células, e, conseqüentemente, com as velocidades máximas de assimilação de nutrientes de cada espécie e suas taxas metabólicas. *Arthrospira platensis* é uma microalga que forma tricomas muito grandes (até 6 µm de largura e 200 µm de comprimento), contrastando com as outras células, cujo tamanho celular é de poucos micrômetros (2 – 10 µm de diâmetro, no caso da *Chlorella*). Essas espécies apresentam maior taxa de divisão celular, o que explica a maior quantidade de biomassa. As curvas de crescimento das microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella sp*, *Cylindrotheca Closterium*, indicadas nas Figuras 5, 6 e 7, o propósito desses experimentos foi traçar as curvas de crescimento dessas espécies nas condições de cultivo visando caracterizar as diferentes fases da curva e o rendimento final em biomassa.

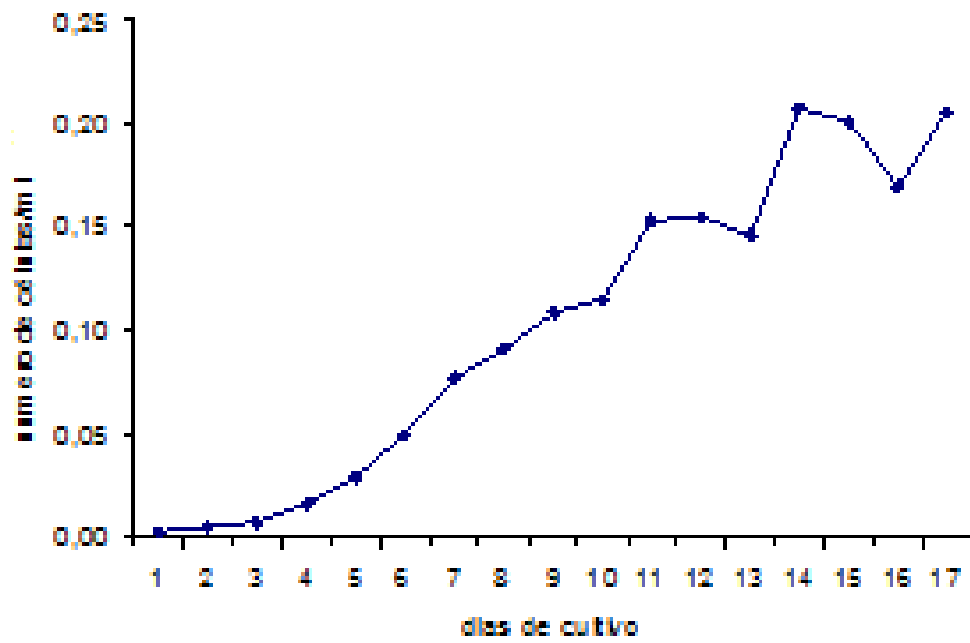


Figura 5. Curva de crescimento da *Arthrospira platensis*.

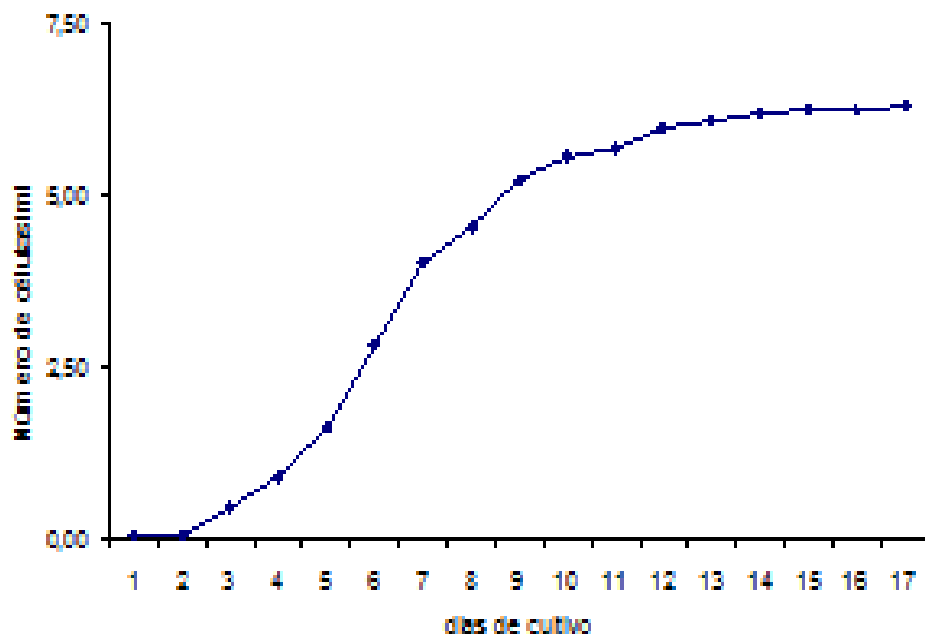


Figura 6. Curva de crescimento da *Chorella sp.*

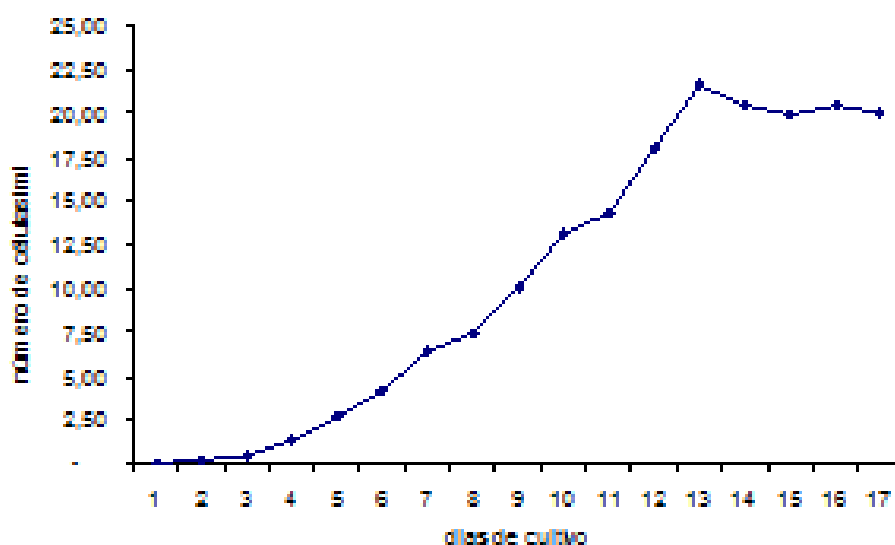


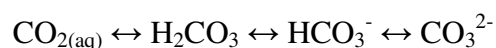
Figura 7. Curva de crescimento da *Cylindrotheca Closterium*

5.2. Monitoramento do pH dos cultivos de Microalgas

O pH dos cultivos foi determinado diariamente por processo eletrométrico em potenciômetro portátil HI 9025 (Hanna Instruments), conforme as Figuras 8, 9 e 10, onde mostram os gráficos da determinação do pH das microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella sp* e *Cylindrotheca Closterium*.

Na figura 8 observa-se um crescimento do pH até o décimo segundo dia, em seguida um pequeno declive e aumento até o décimo sétimo dia aproximando-se de pH = 9,9.

A resistência à difusão da molécula de CO₂ é menor que a do íon HCO₃⁻, tornando o CO₂ a espécie química de carbono inorgânico preferencialmente consumida pelas microalgas. Quando este é consumido, o sistema em equilíbrio



reage no sentido de formação de CO₂, consumindo H⁺ do meio. Assim, seja CO₂ ou HCO₃⁻ a espécie química consumida pelas células, o crescimento celular resulta em aumento do

pH do meio de cultivo. No entanto, ocorreu aumento do pH e queda da concentração de íons HCO_3^- , indicando que, além do crescimento da biomassa, provocam a alteração do pH e da concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio durante o cultivo de microalgas (ANDRADE, CAMERINI, COSTA, 2008).

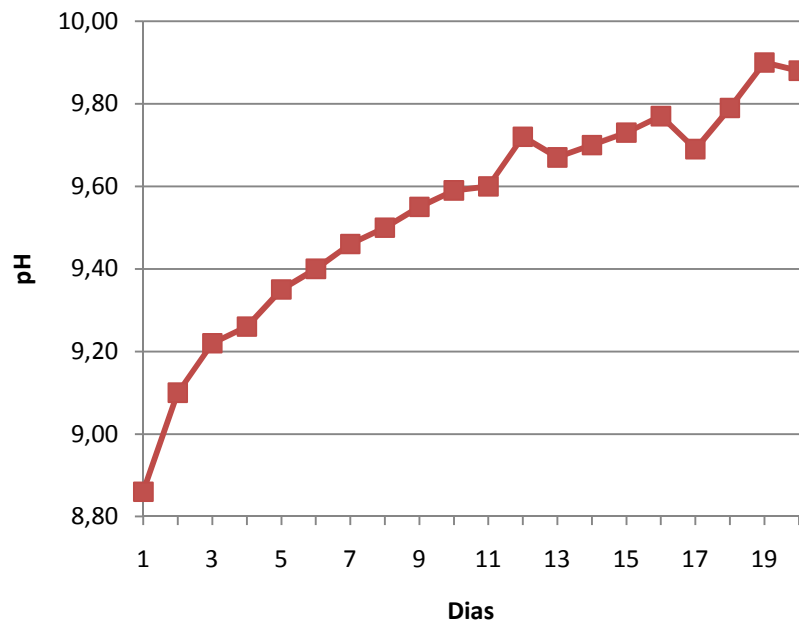


Figura 8. pH do cultivo da Microalga *Arthrospira platensis*.

As figuras 9 e 10 apresentaram um crescimento até o décimo segundo dia permanecendo-se com pH entre 10,2-10,3 até o vigésimo nono dia de cultivo das Microalgas. Esses dados apresentaram semelhanças para as espécies *Chorella sp* e *Cylindrotheca Closterium*

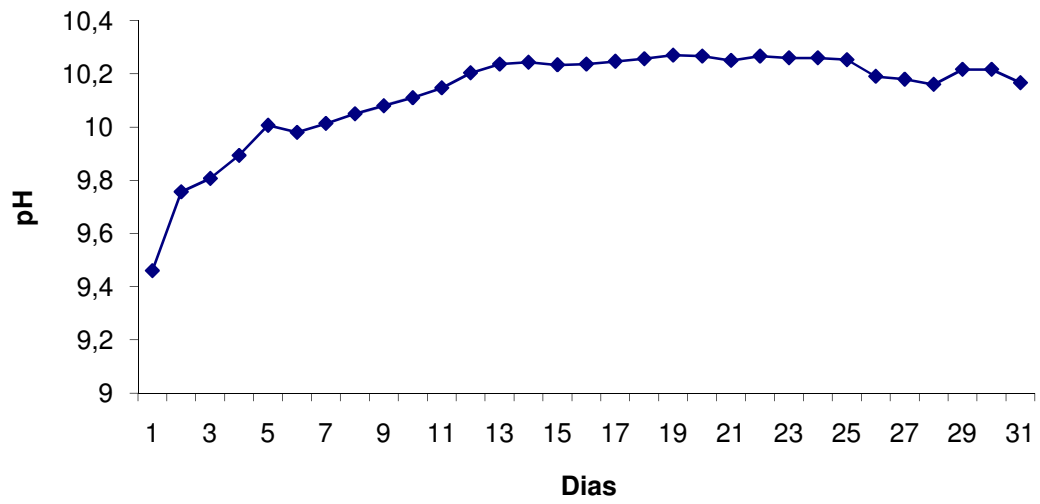


Figura 9. pH do cultivo da Microalga *Chlorella sp.*

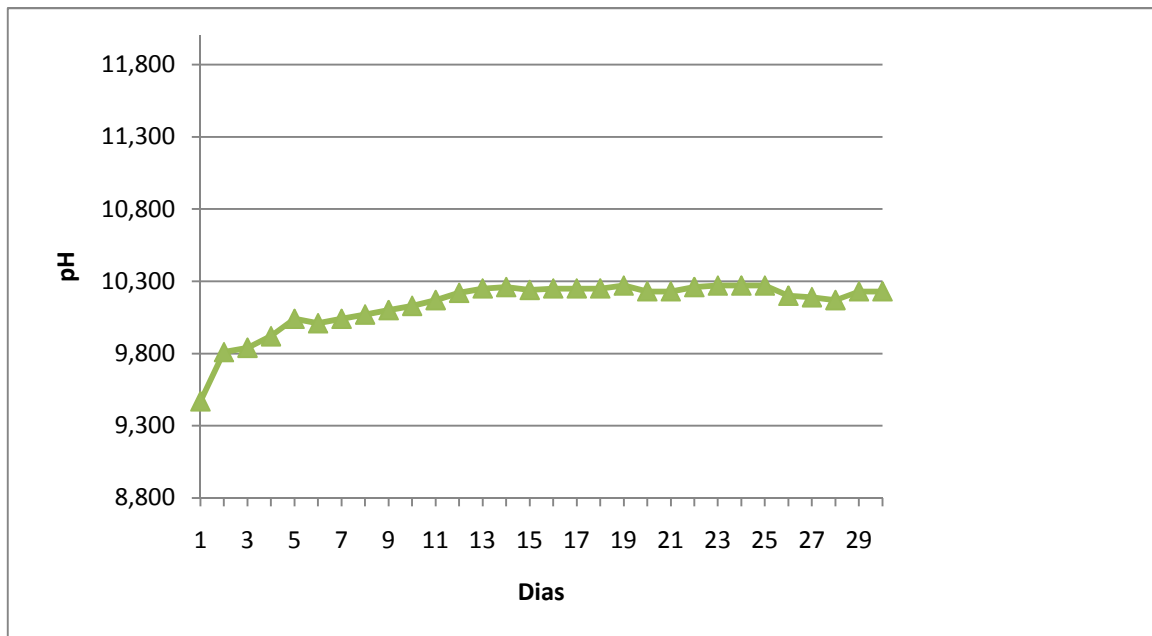


Figura 10. pH do cultivo da Microalga *Cyndrotheca Closterium.*

5.3. Fotografia das Microalgas Obtidas em Microscópio e Características Gerais das Espécies

De acordo com as imagens obtidas pelo microscópio Leica 12x20 – Grande Angular, Figura 11, pode-se verificar que as microalgas possuem formatos diferenciados.

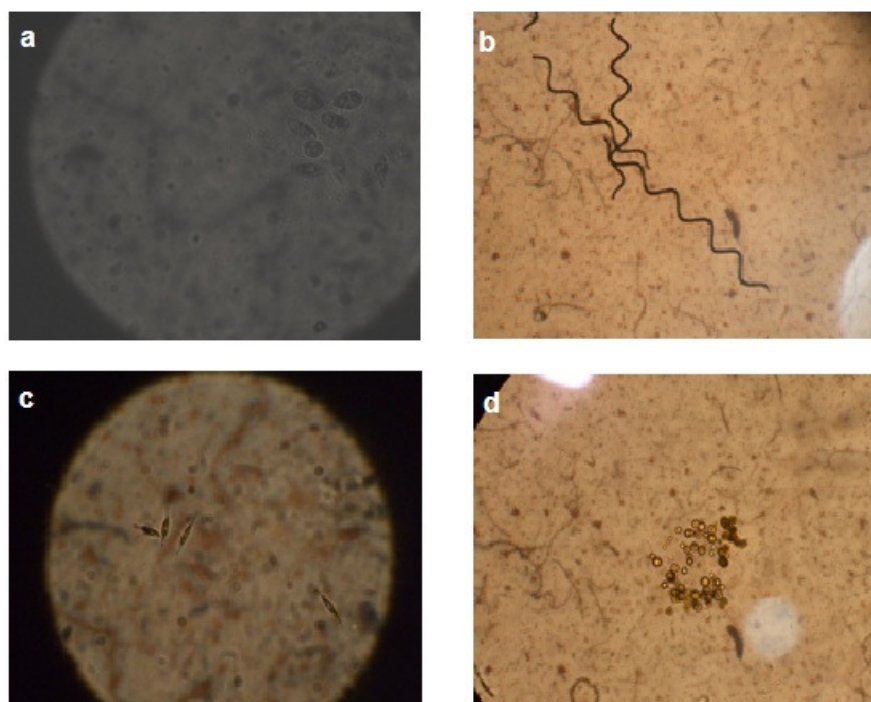


Figura 11. Imagens das microalgas obtidas por microscópio Leica 12x20 – Grande Angular, mantidas no banco de cultivo do LEA. a= *Entomoneis alata*, b= *Arthrospira platensis*, c=*Cylindrotheca Closterium* e d=*Chlorella sp.*

- a) *Entomoneis alata* – Frústulas solitárias de forma semi-elíptica ou semilanceolada e cimbelóides. Valvas assimétricas em relação ao eixo apical, algumas vezes constrictas na região mediana ou próximo às extremidades. Manto ventral ausente ou mais estreito do que o dorsal, o qual contém maior número de cópulas. Estrias uni ou bisseriadas apresentando aréolas arredondadas ou estruturas loculadas complexas. Sistema de rafe excêntrico localizado próximo a margem ventral da valva. Extremidade centrais da rafe retas ou voltadas para um dos lados da valva geralmente expandidas.. Gênero com várias espécies marinhas, mas com representantes de água doce. Espécies epifíticas, epilíticas ou epipélicas. Gênero com cerca de 40 espécies descritas (HUSTEDT, 1930;

KRAMMER; LANGE-BERTALOT, 1986), algumas detalhadas morfológicamente por KRAMMER, (1980). Espécies comuns foram registradas para o território brasileiro por BRASSAC et al (1999);

- b) *Arthrospira platensis* – Os tricomas são solitários e planctônicos ou formam pequenos agregados bentônicos. São, de modo geral, regularmente espiralados (com espiras frouxamente agregados), ou apenas levemente constrictos e não atenuados. Em geral, inexistente bainha mucilaginosa. Exceto em alguns raros casos, os tricomas não apresentam movimento. As células são normalmente quadráticas e os septos, bem visíveis (às vezes marcados por uma fileira de grânulos). O conteúdo celular é verde-azulado escuro ou castanho e apresenta aerótopos apenas nas espécies planctônicas. A célula apical é arredondada ou cônica e quase sempre não tem espessamento polar. A reprodução se dá pela formação de hormogônios ou de hormocistos, com ocorrência de necrídios. O gênero apresenta ao redor de quinze espécies, grande parte das quais é bentônica e algumas são planctônicas em regiões tropicais. Duas de suas espécies são muito usadas como fonte de alimento rico em proteínas.
- c) *Cylindrotheca Closterium* – Células solitárias ou formando colônias estreladas ou lineares. Podem estar incluídas em tubos de mucilagem. Valvas retas ou sigmóides, estreitas, lineares, lanceoladas ou elípticas e às vezes expandidas centralmente. Valvas mais ou menos simétricas em relação ao plano apical, mas em geral fortemente assimétricas. Extremidades geralmente rostradas ou capitadas. Estrias unisseriadas, não interrompidas por estorno lateral, contendo aréolas arredondadas. Canópio ou costelas às vezes presentes. Sistema de rafe de reto a fortemente excêntrico, fibulado e com disposição diagonalmente oposta na epi e na hipovalva da célula. Terminações proximais da rafe simples em algumas espécies e contínuas em outras. Terminações distais simples ou curvadas para a margem distal. Gênero marinho ou de água doce, geralmente epipélico ou planctônico. Gênero amplo, com aproximadamente 200 espécies (LANGE-BERTALOT; SMONSEN, 1978; KRAMMER; LANGE-BERTALOT, 1988), das quais cerca de 45 já foram registradas para o Brasil em trabalhos como os de CONTIN (1990), BRASSAC et al, (1999), VISINONI, (2002) BIGUNAS, (2005);
- d) *Chlorella sp* – Indivíduos sempre solitários e de vida livre. A célula é, em geral, esférica, elipsoidal ou ovóide, mas também pode ser reniforme ou um pouco assimétrica. A parede celular é bem distinta, porém, delgada. O cloroplastídio é único na maioria das vezes, raro ocorrerem dois. Quando único, tem a forma de taça, quando em número de dois, cada um tem a forma de uma calota rasa e aberta. Pirenóide nem sempre presente. Os representantes deste gênero são habitantes principalmente do plâncton de sistemas de águas paradas ou quase,

dos tipos Lagos e reservatórios, mas também podem ser coletados do solo, de ambientes subaéreos e do interior de protozoários ciliados, *Hydra* (celenterado), *Spongilla* (esponja) e de outros componentes da microfauna.

5.4. Análise Cromatográfica do Óleo de Microalgas

As análises cromatográficas permitiram identificar percentuais de ácidos graxos presentes nos diferentes tipos de microalgas. Assim foi possível avaliar a composição, em ácidos graxos, das microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella sp*, *Entemoneis Alata* e *Cylindrotheca Closterium*, ao final dos cultivos em modo semicontínuo em relação aos ácidos graxos totais. Os cromatogramas mostraram que o ácido graxo predominante em todas as microalgas foi o ácido palmítico (C16:0), este perfil qualitativo é semelhante aos obtidos em estudos realizados por, OLGUIN et al.,(2001), DESHNIUM et al. (2000), TANTICHAROEN et al. (1994) e COHEN et al. (1987), os quais foram realizados em condições descontínuas, utilizando temperaturas entre 25 e 35°C, diferentes iluminâncias e concentrações de nitrogênio.

5.4.1. Microalgas *Arthrospira platensis*

O cromatograma dos ácidos majoritários do óleo de microalgas *Arthrospira platensis* esta ilustrado na figura 12. A tabela 4, mostra o percentual e o tempo de retenção dos ácidos graxos com destaque para o Palmítico P(C16:0) que apresentou um teor elevado de 56,94%, seguindo em ordem decrescente pelo Linoléico L(C18:2 *cis* 9,12) e do Oléico O(C18:*cis* 7) com valor de 13,09 e 11,16% respectivamente. Outros ácidos apresentaram teores muito baixo que variaram entre 1,22 e 5,90%.

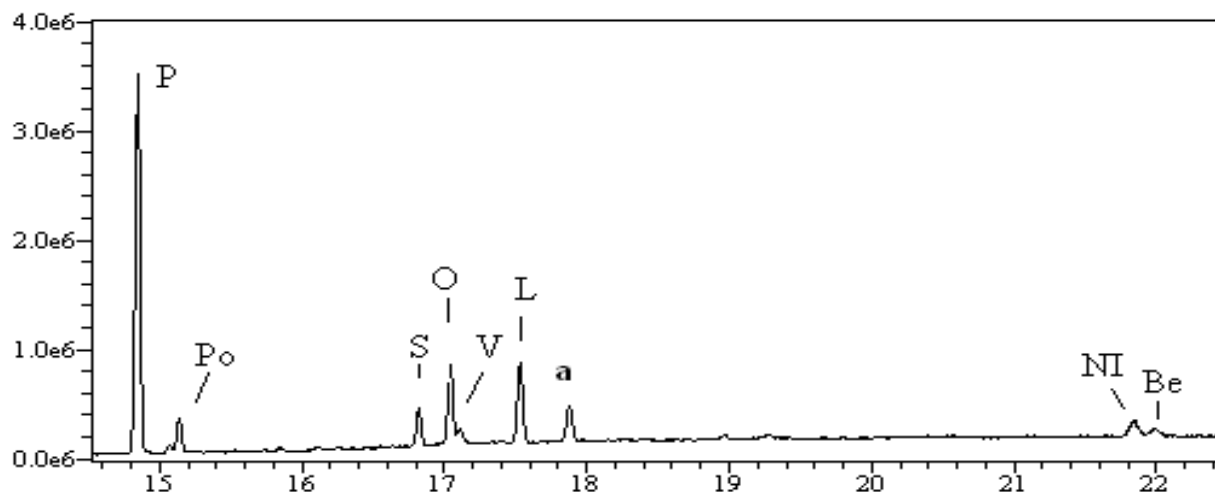


Figura 12. Cromatograma do Óleo Extraído da Microalga *Arthrospira platensis*, no intervalo de 15,0 – 22,0 minutos.

Tabela 4. Resultados da análise Cromatográfica do Óleo Extraído da Microalga *Arthrospira platensis*.

Arthrospira platensis(Nordstedt) Gomont,1892			
Soluto (Simbologia)	Nome	% Total em área	Tempo Retenção (min)
P (C16:0)	Palmítico	56,94	14,78
O (C18:1 cis 7)	Oléico	11,16	16,99
L (C18:2 cis 9,12)	Linoleico	13,09	17,48
a (C18:3 cis 6,9,12)	γ -linoléico	5,99	17,82
Po (C16:1 cis 9)	Palmitoléico	2,28	15,03
S (C18:0)	Estearíco	3,29	16,77
V (C18:1 cis 9)	Vacênico	1,11	17,08
Be (C22:0)	Behênico	1,22	21,92
NI	N. identificado	4,43	21,77

5.4.2. Microalgas *Chlorella* sp

O cromatograma dos ácidos graxos do óleo de microalgas *Chlorella* sp está mostrado na figura 13. A tabela 5, mostra o percentual e tempo de retenção dos ácidos graxos com destaque para o Palmítico P(C16:0) que apresentou um teor 35,97% seguindo em ordem decrescente pelo Vacênico V(C18:1 *cis* 9), Esteárico S(C18:0) e Palmitoléico Po(C16:1 *cis* 9) com valor de 12,08, 10,99 e 9,09% respectivamente. Outros ácidos apresentaram teores que variaram entre 0,39 e 5,36%.

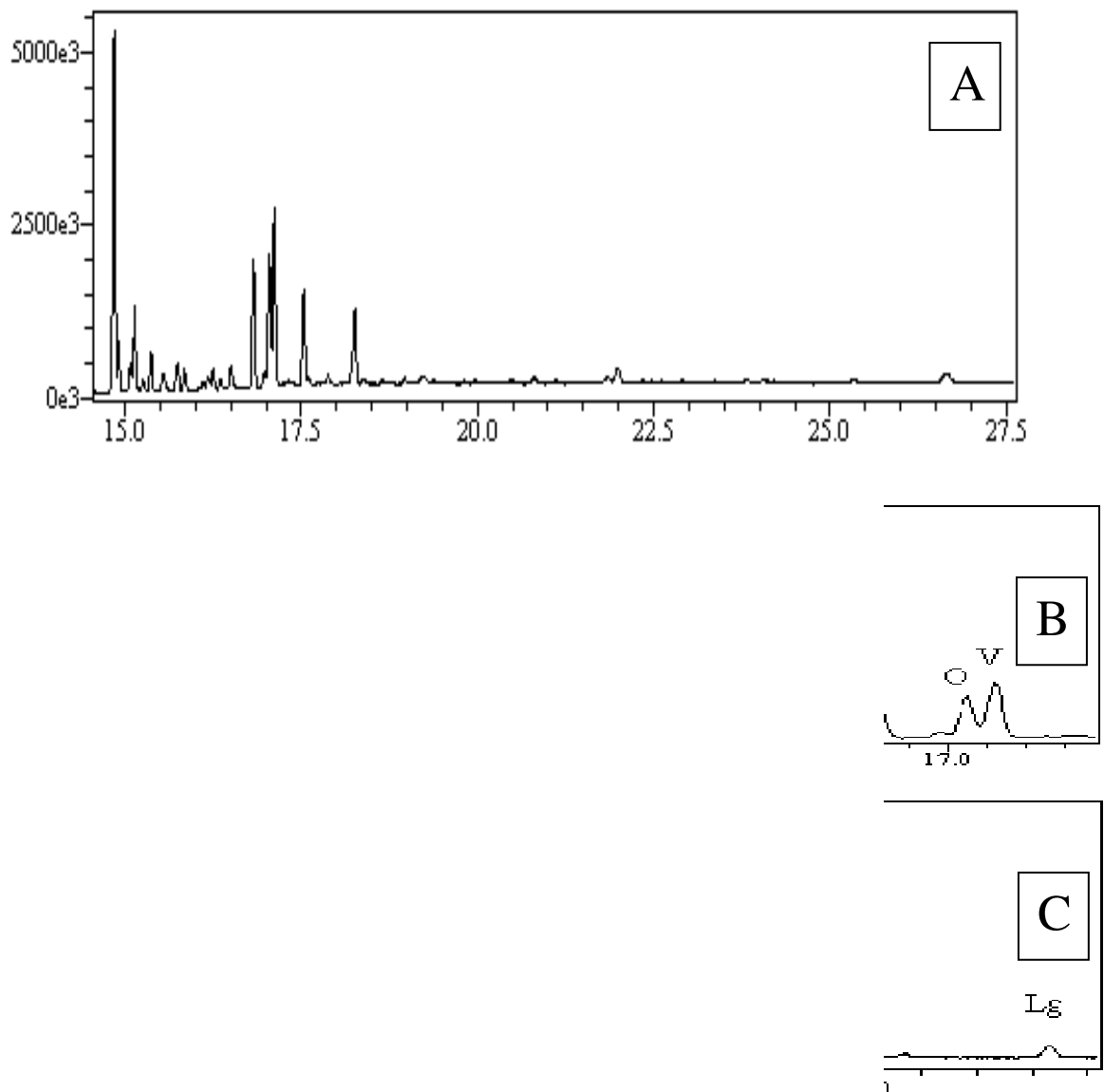


Figura 13. Cromatogramas do óleo extraído da microalga *Clorrella sp* (A); cromatogramas ampliados no tempo de retenção de 15,0 – 17,0 min (B) e de 17,5 – 27,5 min (C).

Tabela 5. Resultados análise Cromatográfica do Óleo Extraído da microalga *Chlrorella sp.*

<i>Chlrorella sp</i>			
Soluto (Simbologia)	Nome	% Total em área	Tempo Retenção (min)
P (C16:0)	Palmítico	35,97	14,79
O (C18:1 cis 7)	Oléico	5,37	17,00
L (C18:2 cis 9,12)	Linoleico	8,93	17,47
a (C18:3 cis 6,9,12)	y-linoléico	0,39	17,85
Po (C16:1 cis 9)	Palmitoléico	9,09	15,02
S (C18:0)	Estereático	10,99	16,78
V (C18:1 cis 9)	Vacênico	12,08	17,08
Ln (C18:3 cis 9, 12, 15)	Linolênico	7,43	18,18
b (C16:2 cis 7, 10)	Àc. Hexadecadienóico	2,05	15,50
Be (C22:0)	Behênico	2,17	21,90
A (C20:0)	Araquídico	0,59	18,93
Ga (C20:1 cis 9)	Gadoléico	1,20	19,15
ARA (C20:4 cis 5,8,11,14)	Araquidônico	0,82	20,74
Lg (C24:0)	Lignocérico	2,08	26,53
NI	Não identificado	0,82	21,77

5.4.3. Microalgas *Entomoneis alata*

O cromatograma dos ácidos graxos das microalgas *Entomoneis alata* está mostrada na figura 14. A tabela 6, mostra o percentual e tempo de retenção dos ácidos graxos com destaque para o Palmitoléico Po(C16:1 *cis* 9) que apresentou um teor 23,37% seguindo em ordem decrescente pelo Palmítico P(C16:0), Mirístico M(C14:0) e Behênico Be(C22:0) com valor de 19,92, 19,79 e 9,19% respectivamente. Outros ácidos apresentaram teores menores que variaram entre 5,28%(Ácido Hexadecadienóico) e 0,49%(Araquidônico).

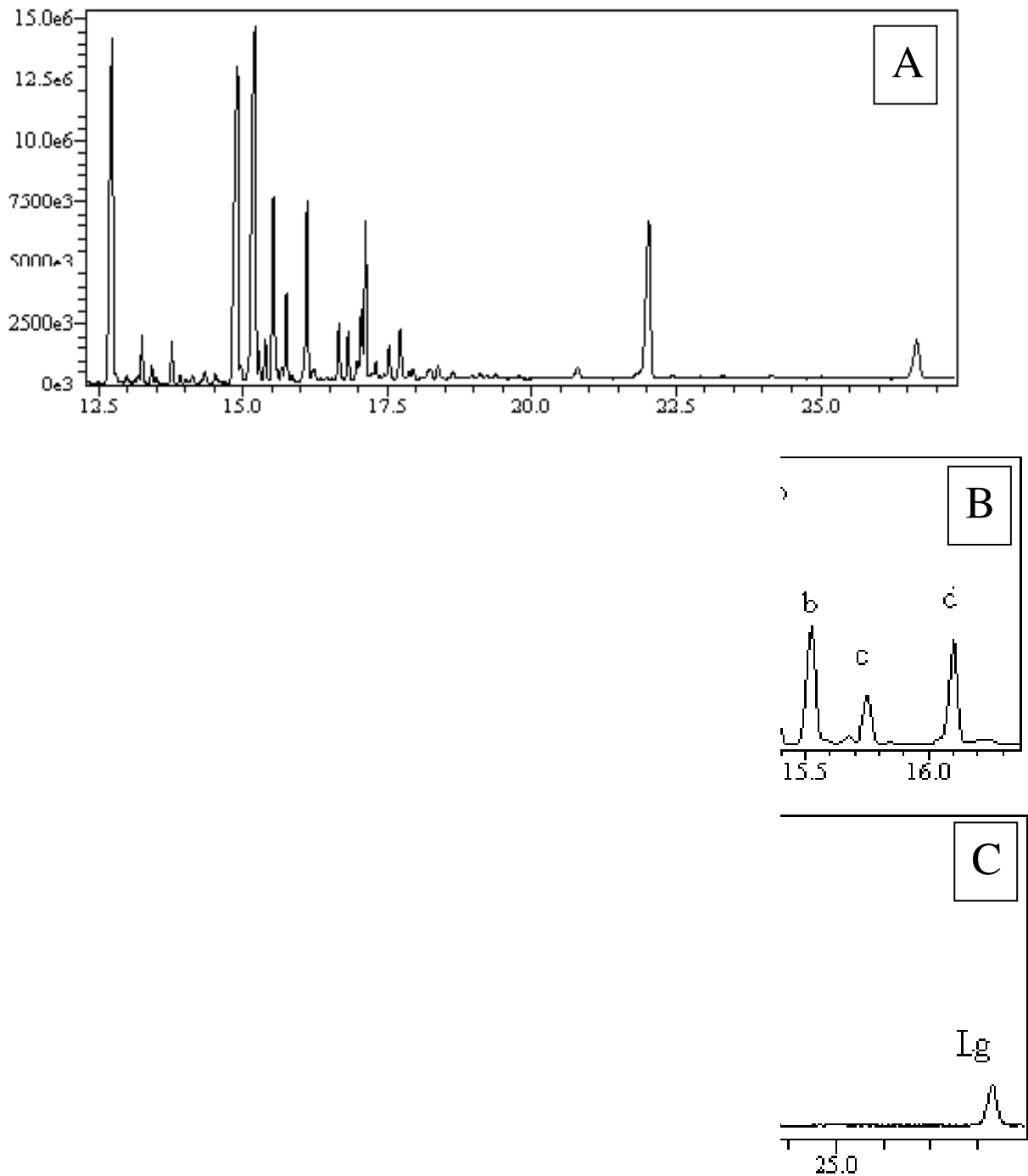


Figura 14. Cromatogramas do óleo da microalga *Entomoneis alata* (A); cromatogramas ampliados até o tempo de retenção de 12,5 – 16,0 min (B) e de 17,5 – 27,5 min (C).

Tabela 6. Resultados da análise Cromatográfica do Óleo Extraído da microalga *Entomoneis alata*.

<i>Entomoneis alata</i>			
Soluto (Simbologia)	Nome	% Total em área	Tempo Retenção (min)
P (C16:0)	Palmítico	19,89	14,78
O (C18:1 cis 7)	Oléico	1,29	17,00
L (C18:2 cis 9,12)	Linoleico	0,82	17,48
a (C18:3 cis 6,9,12)	γ -linoléico	1,36	17,68
Po (C16:1 cis 9)	Palmitoléico	23,34	15,03
S (C18:0)	Estereático	1,05	16,76
V (C18:1 cis 9)	Vacênico	3,90	17,08
Ln (C18:3 cis 9, 12, 15)	Linolênico	0,48	18,20
M (C14:0)	Mirístico	19,79	12,63
b (C16:2 cis 7, 10)	Àc. Hexadecadienóico	5,28	15,48
c (C16:2 cis 9, 12)	Àc. Hexadecadienóico	1,86	15,73
d (C16:3 cis 4, 7, 10)	Àc. Hexadecatrienóico	5,25	16,06
Be (C22:0)	Behênico	9,15	21,90
e (C17:3 cis 5, 8 11)	Àc. Heptadecatrienóico	1,35	16,63
ARA (C20:4 cis 5,8,11,14)	Araquidônico	0,49	20,71
Lg (C24:0)	Lignocérico	2,04	26,52
Mo (C14:1 cis 9)	Miristoléico	1,16	13,21
Pt (C15:0)	Pentadecílico	1,03	13,73
G	Metil linolênico	0,47	18,33

5.4.4. Microalgas *Cylindrotheca closterium*

O cromatograma dos ácidos graxos das microalgas *Cylindrotheca Closterium* está demonstrado na figura 15. A tabela 7, mostra o percentual e o tempo de retenção dos ácidos graxos com destaque para o Palmitoléico Po(C16:1 *cis* 9) que apresentou um teor 18,93% seguindo em ordem decrescente pelo Palmítico P(C16:0), Mirístico M(C14:0) e Behênico Be(C22:0) com valor de 17,43, 13,84 e 8,29% respectivamente. Outros ácidos apresentaram teores mais baixos como é o caso do Ácido Heptadecatrienóico *cis* 5,8,11 com (6,10%) e o Araquidônico com (0,12%).

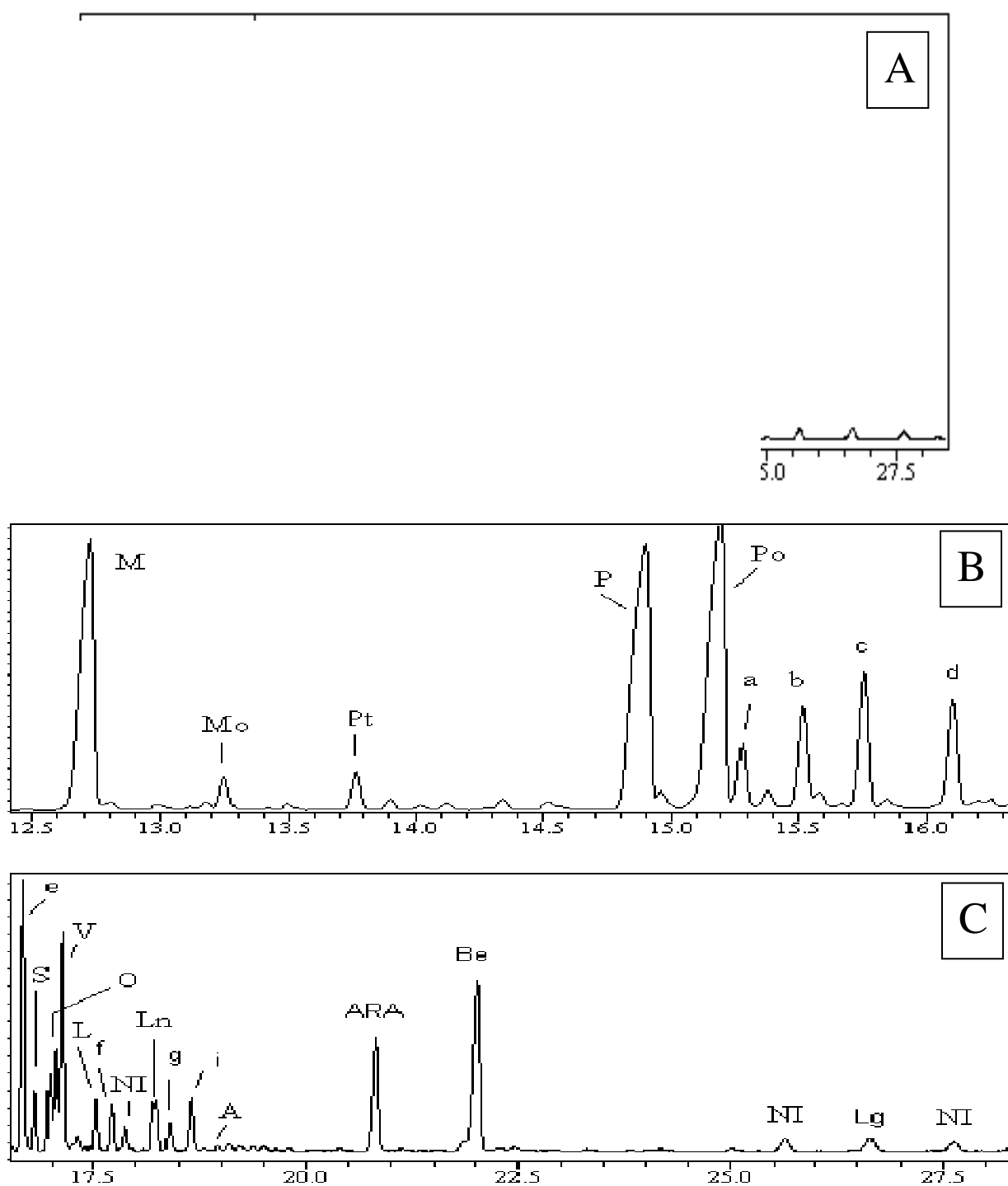


Figura 15. Cromatogramas do óleo Extraído da microalga *Cyndrotheca Closterium*(A) ; cromatograma ampliado no tempo de retenção de 12,5 – 16,0 min (B) e de 17,5 – 27,5 min (C).

Tabela 7. Resultados do Cromatograma do Óleo Extraído da microalga *Cylindrotheca Closterium*.

<i>Cylindrotheca Closterium</i>			
Soluto (Simbologia)	Nome	% Total em área	Tempo Retenção (min)
M (C14:0)	Mirístico	13,84	12,62
Mo (C14:1 cis 9)	Miristoléico	0,73	13,21
Pt (C15:0)	Pentadecílico	1,25	13,73
P (C16:0)	Palmítico	17,43	14,78
Po (C16:1 cis 9)	Palmitoléico	18,93	15,03
a (C16:1 cis 7)	Palmitoléico	1,68	15,24
b (C16:2 cis 7,10)	Ác. hexadecadienóico cis 7,10	2,70	15,48
c (C16:2 cis 9,12)	Ác. hexadecadienóico cis 9,12	4,84	15,70
d (C16:3 cis 4,7,10)	Ác. hexadecatrienóico cis 4,7,10	3,77	16,05
e (C17:3 cis 5, 8, 11)	Ác. heptadecatrienóico cis 5,8,11	6,10	16,62
S (C18:0)	Estearíco	1,19	16,77
O (C18:1 cis 7)	Oléico	2,08	17,00
V (C18:1 cis 9)	Vacênico	4,01	17,08
L (C18:2 cis 9,12)	Linoléico	0,99	17,48
f (C18:3 cis 6,9,12)	γ -linolênico	1,03	17,67
NI	não identificado	0,47	17,83
Ln (C18:3 cis 9,12,15)	Linolênico	2,33	18,18
G	Metil linolênico	0,67	18,33
i (C19:0)	Ác. nonadecanóico	1,34	18,59
A (C20:0)	Araquídico	0,12	18,92
ARA (C20:4 cis 5,8,11,14)	Araquidônico	4,21	20,73
Be (C22:0)	Behênico	8,29	21,90
NI	não identificado	0,69	25,52
Lg (C24:0)	Lignocérico	0,71	26,55
NI	não identificado	0,58	27,54

5.4.5. Análise Comparativa entre os Ácidos Graxos das Microalgas.

5.4.5.1. Saturados

Após os estudos realizados observou-se que algumas microalgas se destacaram como prováveis organismos vivos com possíveis possibilidades de aplicação para obtenção do biodiesel.

A tabela 8 ilustra as composições de matéria graxa que se destacaram como constituintes importantes, visando à produção de biodiesel.

Tabela 8. Composição das amostras determinadas por CG.

Composição percentual	Microalgas			
	<i>Arthrospira Platensis</i>	<i>Chlorella sp</i>	<i>Entomoneis Alata</i>	<i>C. Closterium</i>
M (C14:0)	-	-	19,79	13,84
Pt (C15:0)	-	-	1,03	1,25
P (C16:0)	56,94	35,97	19,89	17,43
S (C18:0)	3,29	10,99	1,05	1,19
I (C19:0)	-	-	-	1,34
A (C20:0)	-	0,59	-	0,12
Be (C22:0)	1,22	2,17	9,15	8,29
Lg (C24:0)	-	2,08	2,04	0,71
Outros	-	-	-	-
TOTAL	61,45%	51,08%	52,95%	44,17%

Entre os óleos das microalgas analisadas a *Arthrospira platensis* e *Chlorella sp* apresentam-se como promissoras com maior teor de ácidos saturados (C16:0) Palmítico, (C18:0) Palmitoléico, que apresentam uma susceptibilidade à oxidação, e conseqüentemente poderão favorecer a produção de biodiesel.

5.4.5.2. Insaturados

A tabela 9 apresenta os índices percentuais de insaturações das microalgas, tendo como a microalga *Cylindrotheca Closterium* com (50,33%), seguida da *Entomoneis alata* (47,10%), *Chlorella sp* com (45,34%) e por último a *Arthrospira platensis* (38,06%).

Tabela 9. Composição das amostras determinadas por CG.

Composição percentual	Microalgas			
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Chlorella sp</i>	<i>Entomoneis alata</i>	<i>C. Closterium</i>
Mo (C14:1 cis 9)	-	-	1,16	0,73
a (C16:1 cis 7)	-	-	-	1,68
Po (C16:1 cis 9)	2,28	9,09	23,34	18,93
b (C16:2 cis 7, 10)	-	2,05	5,28	2,70
c (C16:2 cis 9, 12)	-	-	1,86	4,84
d (C16:3 cis 4, 7, 10)	-	-	5,25	3,77
e (C17:3 cis 5, 8 11)	-	-	1,35	6,10
O (C18:1 cis 7)	11,16	5,37	1,29	2,08
V (C18:1 cis 9)	1,11	12,08	3,95	4,01
L (C18:2 cis 9,12)	13,09	8,93	0,82	0,99
a (C18:3 cis 6,9,12)	5,99	0,39	1,36	1,03
Ln (C18:3 cis 9, 12, 15)	-	7,43	0,48	2,33
ARA (C20:4 cis 5,8,11,14)	-	-	0,49	-
NI	4,43	-	-	0,47
G	-	-	0,47	0,67
TOTAL	38,06%	45,34%	47,10%	50,33%

NI: Não identificado

De acordo com a literatura, as microalgas produzem muitos compostos que podem apresentar maior susceptibilidade à oxidação, isso se dá devido aos elevados níveis de ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua cadeia graxa. Porém, os compostos poli-insaturados apresentam um ponto de congelamento muito mais baixo do que os mono-insaturados ou saturados. Isso faz com que o biodiesel obtido a partir dos óleos de microalgas tenha propriedades muito mais adaptadas a regiões de clima frio, do que o biodiesel obtido de outras fontes.

Entretanto, a diferença mais significativa, refere-se ao rendimento do óleo extraído das microalgas, isso porque de acordo com algumas estimativas, o rendimento do óleo de microalgas é duzentas vezes maior do que os óleos de outras fontes, tais como: palma, mamona, soja etc. (TOMASINI *et al*, 2008).

6. CONCLUSÃO

- ✓ Após a realização do presente estudo pode-se concluir que as microalgas tem como principal vantagem em relação aos vegetais superiores a possibilidade de cultivo em águas residuais (impróprias para uso), assim como em pequenas áreas com luz solar, CO₂ e água em quantidade suficiente, não comprometendo áreas de cultivo para alimentação humana.
- ✓ O desenvolvimento de cultivo das microalgas se apresenta bastante promissor por apresentar altas taxas de crescimento, o que implica em um aumento considerável na produtividade de matéria graxa.
- ✓ Os resultados das análises indicaram que os óleos obtidos das microalgas cultivadas apresentam potencialidades para a produção de biodiesel, pois contém um teor significativo de lipídios. Os ácidos graxos encontrados nos óleos das microalgas diferem-se, principalmente, pela espécie de microalgas.
- ✓ Com relação aos óleos extraídos das microalgas, as espécies *Arthrospira platensis* com 61,45%, seguida da *Entomoneis alata* com 52,95% e a *Chlorella sp* com 51,08%, apresentaram-se bastante promissoras quanto ao teor de ácidos saturados, sendo assim, as espécies mais indicadas para a produção de biodiesel devido ao menor percentual de ácidos insaturados.
- ✓ A Cromatografia Gasosa utilizando detector DIC/MS se destacou como técnica importante na elucidação da composição química dos óleos das microalgas cultivadas. O método utilizado foi eficiente para separar os constituintes dos óleos e os cromatogramas apresentaram alta eficiência de separação dos solutos, com ausência de distorção do perfil dos picos.
- ✓ Em relação ao sistema de cultivo, faz-se necessário um aumento da produtividade em biomassa, sem acarretar aumento de custos de instalação e operação. Porém, é

de extrema importância a criação de uma rede de uso de microalgas para a produção de biodiesel, que incluiria uma gama imensa de estudos.

- ✓ O cultivo de microalgas apresenta várias características interessantes: custos relativamente baixos para a colheita e transporte e menor gasto de água, comparados aos de cultivo de plantas; pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar propriedades específicas do biodiesel obtido dos óleos das diferentes microalgas estudadas;
- Desenvolver uma rede de uso de microalgas para a produção de biodiesel para investigar outros tipos de microalgas, contribuindo desta forma para diversos estudos relacionados a esta área;
- Realizar estudo analítico do óleo extraído das microalgas; as espécies *Arthrospira platensis* com 61,45%, seguida da *Entomoneis alata* com 52,95% e a *Chlorella sp* com 51,08% do teor de ácidos saturados, pois essas espécies apresentaram-se como as mais indicadas para a produção de biodiesel devido ao menor percentual de ácidos insaturados;
- Desenvolver estudo cromatográfico com auxílio da Micro-Extração em Fase Sólida e ou Líquida (μ -SPME) acoplado a “headspace” para identificação de compostos presentes no óleo antes e após o processo de extração, evitando eventuais perdas de compostos inerentes ao processo.

8. REFERÊNCIAS

ABE, D. S.; GALVÃO, S. M. F. G. Pigment chromatic adaptation in *Cyclotella caspia* Grunow (Bacillariophyta). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 39, n. 2, p. 123-130, 1991.

ANDRADE, M.R.; CAMERINI, F.V.; COSTA, J.A.V. Perda Química de Carbono e Cinética do Crescimento Celular em Cultivo de Spiurlina. **Química Nova**, Vol 31, 2008, São Paulo.

BARROS, K. K da S. “**Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* para alimentação humana**”. 2010. 111p. Dissertação(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

BARROS, K. K. da S.; SASSI, R. Uso de microalgas na alimentação humana e animal: tecnologia de produção e valor nutricional de concentrados algáceos obtidos em cultivo em massa. In: Encontro de Iniciação Científica, 15º, 2007, João Pessoa. **Anais eletrônicos...** João Pessoa: UFPB, 2007.

BIGUNAS, P.I.T., et al. Diatomáceas (Ochrophyta) do rio Guaraguaçu, litoral do Paraná, Brasil, <http://hdl.handle.net/1884/2313>

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. v.70, n. 3, p.313-321, Apr. 1999b.

BRAND, L. E. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 18, n. 5, p. 543-556, May. 1984.

BRASSAC, N.M.; ATAB, D.R.; LANDUCCI, M.; VISINONI, N.D. & LUDWIG, T.V. 1999. Diatomáceas cêntricas de rios na região de abrangência da usina hidrelétrica de Salto Caxias, Pr (Bacia do Iguaçu). **Acta Botanica Brasílica** 13(3): 277-289.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 4, p. 315-331, May. 1997.

BURLEW, J.S. 1953. **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, USA, 600p.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, May./June. 2007.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, May. 2007.

CONTIN, L.F. 1990. Contribuição ao estudo das diatomáceas (Chrysophyta, Bacillariophyceae) na região de captação d'água do rio Iguaçu (SANEPAR), em Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia** (24): 5-95.

CONVERTI, C.; LODI, A.; BORGHI, A. D.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n.1, p. 13-18, Nov. 2006.

DARLEY, W. M. Algal Biology: a physical approach. In: WILKINSON, J. F. (ed.) **Basic Microbiology**. v. 9, Blackwell Scientific Publications, p. 30-52, 1982.

DERNER, R. B. **Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe *Bacillariophyceae*) sob diferentes regimes de iluminação, na Região Sul do Brasil**. 1995. 108 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DERNER, R. B. ; OHSE, S. ; VILLELA, M. ; CARVALHO, S. M. de ; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959 – 1967, Nov./Dez. 2006.

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, p. 101-116. 1990.

GLASS, A. D. M. Regulation of ion transport. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, n. 1, p. 311-326, June. 1983.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHARLEY, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, p. 29-60. 1975.

HENRIQUES, N. M.; NAVALHO, J. C; VARELA, J. C ; CANCELA, M. L. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n. 61, p. 12-18, Dez. 1998.

HUSTEDT, F.1930. Die Susswasserflora Mitteleuropas. Heft 10. 2nd Edition. Bacillariophyta (Diatomeae). A. Pascher (ed.) Verlag von Gustav Fischer, Germany. 466p.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperatura on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 5, p. 495-504, Oct. 1993.

JORNAL TAMANDUÁ (2005), PARRY NUTRACEUTICALS (2006).

KRAMMER, K 1980. Morphological and Taxonomic Investigations of Some Freshwater Species of the Diatom genus Amphora Ehr. *Bacillaria* 6:197-226.

KRAMMER, K. and LANGE-BERTALOT, H. 1986. Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. in Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. and Mollenhauer, D. (eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/1. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, New York. 876 pp.

KRAMMER, K. and LANGE-BERTALOT, H. 1988.. Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. in Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. and Mollenhauer, D. (eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/2. VEB Gustav Fischer Verlag: Jena. 596 pp.

LANGE-BERTALOT, H. and R. SIMONSEN. 1978. A Taxonomic Revision of the *Cylindrotheca e lanceolatae* Grunow. 2. European and Related Extra-European Freshwater and Brackish Water Taxa. *Bacillaria* 1: 11-112.

LITCHFIELD, J. H. Single cell protein. **Food Technology**, v. 31, p. 175-179. 1977.

LOURENÇO, S. de O. **Variação da composição bioquímica de microalgas em cultivos, com ênfase nos efeitos da disponibilidade do elemento nitrogênio**. 1996. 284 p. Tese (Doutorado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

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

LOURENÇO, S. O.; MARQUES JUNIOR, A. N. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 195-227. 2002.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, Jan. 2010.

MILLER, A. G.; COLMAN, B. Evidence for HCO₃⁻ transport by the blue-green alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2 p. 397- 402, Fev. 1980.

MOHEIMANI, N. R. **The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation**. 2005. 247 p. Theises (Ph. D.), Murdoch University, Australia, 2005.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ, J. A.; GÒDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 535-547, Dec. 2001.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 19-24, Mar. 2001.

OLIVEIRA, A. **Crescimento das diatomáceas bacillariophyceae *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade.** 1993. 204 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

ONCEL, S.; SUKAN, F. V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4755-4760, July. 2007.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G. A; RANGEL, C. O. A.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 371-375, Mar. 2003.

PEREZ, H. E. B. “Biodiesel de Microalgas”, parte 1, 2007.

RICHMOND, A. Phototropic microalgae. In: REHM, H. J.; REED, G. (eds.) **Biotechnology**. v.3, Weinheim: Verlag Chemie, 1983. 239 p.

REVISTA BIODIESEL, Agosto de 2009, Editora Letra Boreal.

RICHMOND, A. Phototropic microalgae. In: REHM, H. J.; REED, G. (eds.) **Biotechnology**. v.3, Weinheim: Verlag Chemie, 1983. 239 p.

RIVKIN, R. B. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. 1. Photosynthesis, chemical composition and growth. **Marine Ecology Progress Series**, v. 55, n. 2-3, p. 291-304, 1989

SAMUELSSON, G.; LÖNNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v. 79, n. 1, p. 992-995, 1985.

SHELEF, G.; SOEDER, C. J. **Algae Biomass: production and use**. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical, 1980. 852 p.

SUNDA, W. G.; PRICE, N. M.; MOREL, F. M. M. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: (ed.) ANDERSON, R., *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, p. 35-63. 2005.

TEIXEIRA, C. M. L. L.; Divisão de Energia – Instituto Nacional de Tecnologia, 2008.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: Editora da UFRS, 1987. 180p.

TOMASINI et al “Determinação do teor de lipídios de microalgas visando à obtenção de biodiesel, (2008). XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQ Sul).

TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.178-214. 2004.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, July. 2008.

VONSHAK, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, p. 117-145. 1990.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor Francis, 1997. 233 p.

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*.
Fishery Investigations, v.25, n.4, p.1-53, 1966.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée:** influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. 1966. Theises (Ph. D.) - Faculty of Science, Université des Paris, Paris,1966.