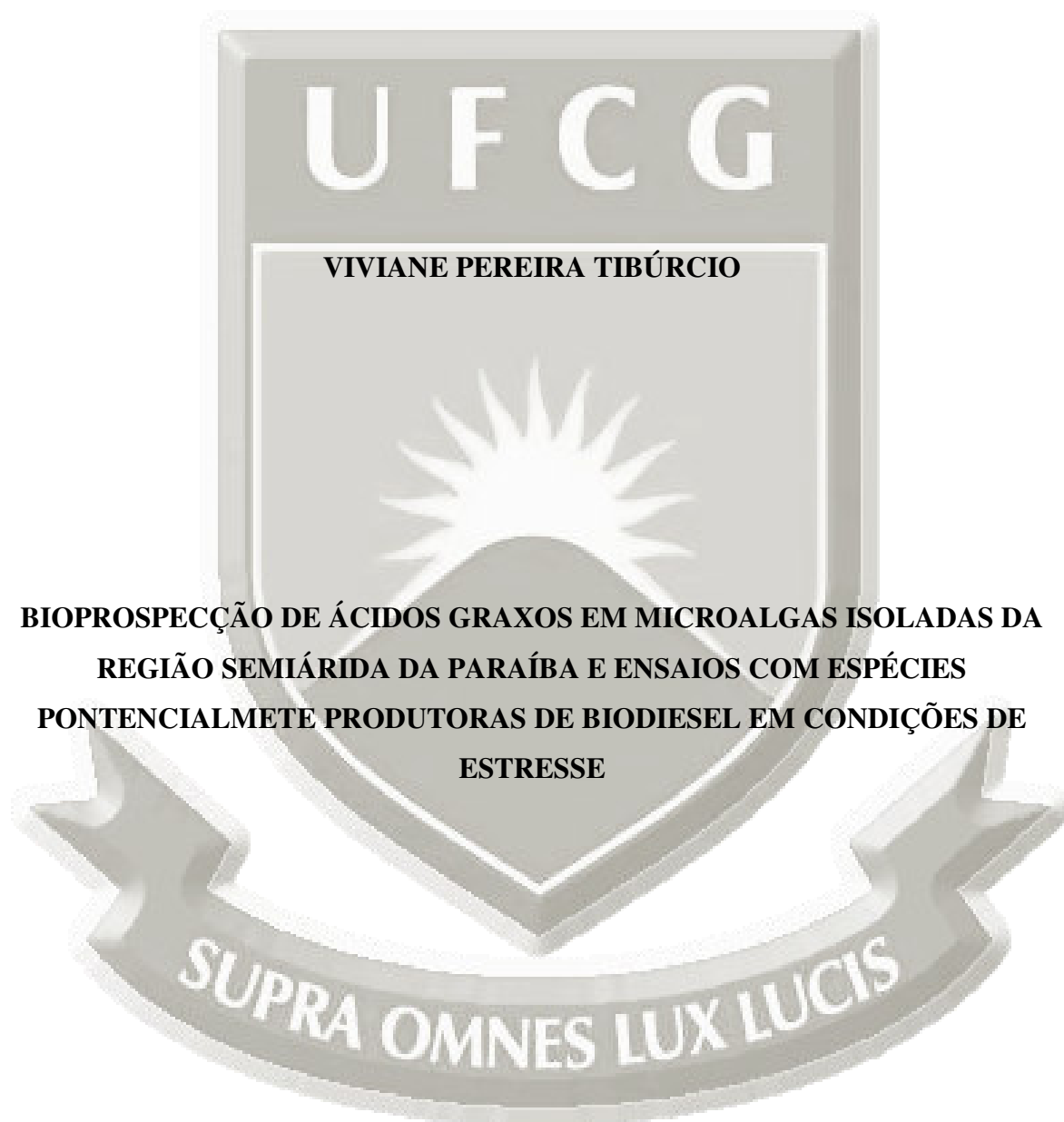




UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



CAMPINA GRANDE-PB

2014

VIVIANE PEREIRA TIBÚRCIO

**BIOPROSPECÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM MICROALGAS ISOLADAS DA
REGIÃO SEMIÁRIDA DA PARAÍBA E ENSAIOS COM ESPÉCIES
POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE BIODIESEL EM CONDIÇÕES DE
ESTRESSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo.

***Bolsista Capes**

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

CAMPINA GRANDE-PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

T554b

Tibúrcio, Viviane Pereira.

Bioprospecção de ácidos graxos em microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba e ensaios com espécies potencialmente produtoras de biodiesel em condições de estresse / Viviane Pereira Tibúrcio. – Campina Grande, 2014.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo".

Referências.

1. Biodiesel. 2. Microalga. 3. *Pediastrum tetras*. 4. *Scenedesmus acuminatus*. I. Araújo, Gilmar Trindade de. II. Título.

CDU 665.75(043)





UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO
DA ALUNA VIVIANE PEREIRA TBÚRCIO**

TÍTULO: Bioprospecção de Ácidos Graxos em Microalgas Isoladas da Região Semiárida da Paraíba e Ensaio com Espécies Potencialmente Produtores de Biodiesel em Condições de Estresse

COMISSÃO EXAMINADORA

CONCEITO

Prof. Gilmar Trindade de Araújo (Doutor)

Aprovado

Gilmar Trindade de Araújo
(Orientador)

Prof. Roberto Sassi (Doutor)

APROVADA

Roberto Sassi
(Examinador Externo)

Prof. Howard William Pearson (Doutor)

APROVADO

Howard William Pearson
(Examinador Externo)

Campina Grande, 10 de outubro de 2014

*A Deus e a minha abençoada família,
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre me iluminando e abençoando. Permitindo que mais uma etapa em minha vida seja cumprida, pois tudo que conquistei é graças a esse Deus tão bondoso e amoroso;

Aos meus amados pais José Alves Tibúrcio e Jusilene Pereira Tibúrcio por terem dedicado a sua vida a me incentivar, ensinar, dar os passos certos para o futuro e sempre mostrando o melhor caminho para que eu não erre.

Ao meu amado Fernando Hamdan, meu verdadeiro companheiro (que seja para sempre). Obrigada pelo apoio e por sempre querer meu crescimento. Te amo!!

A meu irmão Victor, que nesses últimos tempos tem-se mostrado como é importante ter fé em Deus e como Ele é bom para nossas vidas.

Ao meu estimado professor Roberto Sassi ao qual sou muito grata pela oportunidade dada por trabalhar em seu laboratório, por ter se dedicado bastante ao meu trabalho e sempre muito satisfeito em compartilhar o seu conhecimento. Serei eternamente grata!!

A professora Cristiane F. Costa Sassi, sempre disponível a ajudar, agradeço também por compartilhar sempre o seu conhecimento.

A minha amigona Anna Luiza (a qual tenho muito carinho), ajudou bastante nesse trabalho, dedicando sempre um pouco do seu tempo em qualquer hora. Obrigada!!!

A minha família LARBIM (Aline, Evandro, Clediana, Cayro, Giussepp, Katarina, Jordana, Patrícia e Renata) que para mim são literalmente uma família, pessoas que compartilho meus sentimentos no dia-a-dia. Sem eles não teria conseguido realizar todo o trabalho. Vocês são incríveis!! As nossas técnicas maravilhosas Dora, Guida e Neide, responsáveis por alegrar nossas manhãs. Adoro vocês!!! Ao técnico André sempre presente!

Ao professor Gilmar Trindade de Araújo pela confiança depositada em mim, por estar sempre disposto a tirar as dúvidas e constantemente incentivando a continuar com minha carreira acadêmica.

Ao professor Howard Willian Pearson por ter se disponibilizado a agregar valor ao meu trabalho, prestando participação a banca examinadora.

Ao professor Luiz Vasconcelos também muito paciente comigo sempre disposto a ajudar.

Ao professor Josean Fechinne que disponibilizou o seu laboratório para que alguns ensaios fossem realizados em seu laboratório.

Aos técnicos Sócrates e Alexandro que também deram uma grande força para que algumas análises fossem realizadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia química, pela oportunidade de realização deste curso e ao REUNI pela concessão da bolsa.

Ao MCTI/FINEP pelo suporte financeiro ao projeto “Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação na Produção de Biodiesel de Óleos Derivados de Microalgas (processo N° 2555/09)”, do qual fez parte esta pesquisa.

Ao Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho do Laboratório de Métodos de Extração e Separação da Universidade Federal de Goiás e sua equipe, pelas análises de ácidos graxos por cromatografia a gás.

E a todos que, de forma direta e indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivo específico.....	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 Caracterização das microalgas.....	23
3.2 Cultivo de microalgas.....	25
3.3 Fatores limitantes ao crescimento das microalgas	27
3.4 Biodiesel.....	31
3.5 Biodiesel a partir de microalgas.....	33
4 METODOLOGIA	36
4.1 Obtenção dos cultivos, ensaio de produção de biomassa e análises de ácidos graxos.....	36
4.2 Ensaio em condições de estresse com cepas selecionadas.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Espécies de microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba e analisadas quanto aos teores e perfil de ácidos graxos.....	41
5.2 Análise bioquímica da espécie D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) submetida a estresse nutricional.....	45
5.3 Análise bioquímica da espécie D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) submetida a estresse luminoso.....	48
5.4 Crescimento e análise bioquímica das microalgas D115WC (<i>Scenedesmus acuminatus</i>) e D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) submetidas a estresse térmico.....	51
5.4.1 <i>Scenedesmus acuminatus</i>	51
5.4.2 <i>Pediastrum tetras</i>	53

5.5 Avaliação do indicativo de ácido graxo por FTIR (Transformada de Fourier) para a espécie D121WC (<i>pediastrum tetras</i>) nas três condições de cultivo sob estresses que foram estudadas.....	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação da biomassa em uma cultura descontínua.....	26
Figura 2. Percentuais mínimos da mistura biodiesel ao diesel.....	31
Figura 3. Fluxograma de processo de produção do biodiesel.....	32
Figura 4. Curva de crescimento da microalga D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) em estresse nutricional. Ponto a = início da fase estacionária, quando o experimento foi interrompido em dois balões, a biomassa foi colhida e nova adição de todos os nutrientes do meio WC, porém sem nitrogênio (deprivação N ₂) foi efetuado nos outros dois balões. Ponto b = final do experimento, quando a biomassa dos dois balões com deprivação de N ₂ foi colhida.....	46
Figura 5. Respostas de crescimento da microalga D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) o dobro (y umol.fotons.m ² .s ⁻¹ até o 23º dia (Ponto a) e com estresse fótico positivo de aproximadamente umols. Fótons), o 24º ao 27º dias.....	49
Figura 6. Crescimento da microalga D115WC (<i>Scenedesmus acuminatus</i>) a 25°C e a 30°C até o 14º dia de cultivo e transferência de um dos frascos de 25°C para 30°C a partir do 14º dia (estresse positivo de 5°C).....	52
Figura 7. Crescimento da microalga D115WC (<i>Scenedesmus acuminatus</i>) em células por ml.10 ⁵ a 25°C e a 30°C até o 14º dia de cultivo e transferência de um dos frascos de 25°C para 30°C a partir do 14º dia (estresse positivo de 5°C).....	52
Figura 8. Crescimento da microalga D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) a 25°C e transferência de dois frascos de 25°C para 30°C no 24º dia (estresse positivo de 5°C....	54
Figura 9. Teores de ácidos graxos nas três condições de cultivo em estresse (nutricional, fótico e térmico) para a espécie D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do rendimento em óleo de microalgas com o rendimento por algumas oleaginosas.....	19
Tabela 2. Conteúdos dos principais componentes químicos das espécies <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella emersonii</i> , <i>Chlorella protothecoide</i> e <i>Chlorella Minutíssima</i>	24
Tabela 3. Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1996).....	36
Tabela 4. Composição do meio WC (Guillard; Lorenzen,1972).....	37
Tabela 5. Relação das microalgas oriundas da região semiárida da Paraíba utilizadas dos ensaios de produção de biomassa e análises de ácidos graxos. Z = Zarrouk água doce; WC = meio WC água doce; CLO = Clorofíceas; CIA = Cianobactéria.....	41
Tabela 6. Constante de crescimento <i>k</i> (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g) e totais de ésteres metílicos de ácidos graxos (%) das microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba.....	44
Tabela 7. Dados do cultivo sob estresse nutricional obtidos para cepa D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) em condições de laboratório.....	46
Tabela 8. Análises bioquímicas na biomassa cultivada da cepa D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>), antes e depois de submetida ao estresse nutricional por deprivação de N ₂ na fase estacionária.....	47
Tabela 9. Dados do cultivo sob estresse fótico obtidos para a cepa D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) em condições de laboratório.....	50
Tabela 10. Composição bioquímica de <i>Pediastrum tetras</i> em cultivo sob estresse fótico.....	50

Tabela 11. Valores de proteínas, lipídeos e carboidratos obtidos para a microalga D115WC (<i>Scenedesmus acuminatus</i>) nas duas condições de temperatura testadas.....	53
Tabela 12. Dados de cultivo em laboratório da cepa D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) em diferentes condições térmicas.....	54
Tabela 13. Valores de proteínas, lipídeos e carboidratos obtidos para a microalga D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) nas duas condições de temperatura testadas.....	55
Tabela 14- Indicativo de ácido graxo (por FTIR) da espécie D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) para o cultivo em condição de estresse nutricional.....	56
Tabela 15. Indicativo de ácido graxo (por FTIR) da espécie D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) para o cultivo em condição de estresse luminoso.....	56
Tabela 16. Indicativo de ácido graxo (por FTIR) da espécie D121WC (<i>Pediastrum tetras</i>) para o cultivo em condição de estresse térmico.....	57

Título: Avaliação do teor de ácido graxo das microalgas *Pediastrum tetras* e *Scenedesmus acuminatus* sob fótico e térmico para produção de biodiesel.

Autora: Viviane Pereira Tibúrcio.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo.

RESUMO

A busca por alternativas energéticas viáveis, de baixo custo, sustentáveis e que possam substituir o uso de combustíveis fósseis tem aumentado. Neste contexto, os biocombustíveis derivados de microalgas torna-se uma opção promissora quer seja do ponto de vista econômico como do ponto de vista ambiental. Os cultivos de microalgas produzem elevada quantidade de biomassa em curto tempo e não requerem extensas áreas para sua produção como acontece com a cana de açúcar utilizada para a produção de etanol, ou a soja, no caso do biodiesel. Este trabalho teve o propósito de caracterizar o potencial de produção de ácidos graxos de microalgas isoladas da região semiárida do estado da Paraíba mantidas em cultivo monoespecífico no banco de culturas de microalgas do LARBIM/UFPB e selecionar espécies potencialmente produtoras desses compostos visando cultivá-las em diferentes condições de estresse com o propósito de incrementar o rendimento final dos ácidos graxos de interesse à produção de biodiesel. Os cultivos foram desenvolvidos utilizando os meios Zarrouk e WC em câmara de cultura a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ dotada de sistema de iluminação, com fotoperíodo de 12 horas. Foram estudadas 12 cepas incluídas em 7 espécies representantes dos grupos das cianobactérias e clorofíceas. A quantificação de ácidos graxos de cada uma das microalgas estudadas, foi determinado por cromatografia a gás. Duas espécies *Pediastrum tetras* (D121WC) e *Scenedesmus acuminatus* (D115WC) apresentaram teores de ácidos graxos 802,1% em relação a soja 211,1% em relação a soja, respectivamente. Por essa razão essas espécies foram cultivadas em diferentes condições de estresse nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo, utilizando-se estresses fótico, térmico e nutricional. Ao final de cada experimento foram determinadas para cada condição testada, os teores de proteínas, lipídeos e carboidratos. As curvas de crescimento foram acompanhadas por medida de fluorescência *in vivo*, em triplicatas, e todos os parâmetros de crescimento foram analisados para cada espécie testada. Observou-se maior taxa de divisão celular por dia na espécie D112Z (0,71 divisão/dia). Os teores de ácidos graxos na cepa D121WC aumentaram mais do que o dobro sob a condição de estresse fótico. Já para a espécie D115WC ocorreu um aumento no rendimento de ácido graxo ao condicioná-la a estresse térmico de 590,8% em relação à soja. Apesar das duas espécies testadas (*Pediastrum tetras* e *Scenedesmus acuminatus*) serem potencialmente importantes para a produção de biodiesel, evidenciou-se que suas respostas fisiológicas às condições de estresse não são as mesmas.

Palavras-chave: biodiesel; microalga; *Pediastrum tetras*; *Scenedesmus acuminatus*.

Title: Evaluation of fatty acid content of microalgae *Pediastrum tetras* any *Scenedesmus acuminatus* under conditions of nutritional stress photic and thermal for biodiesel production

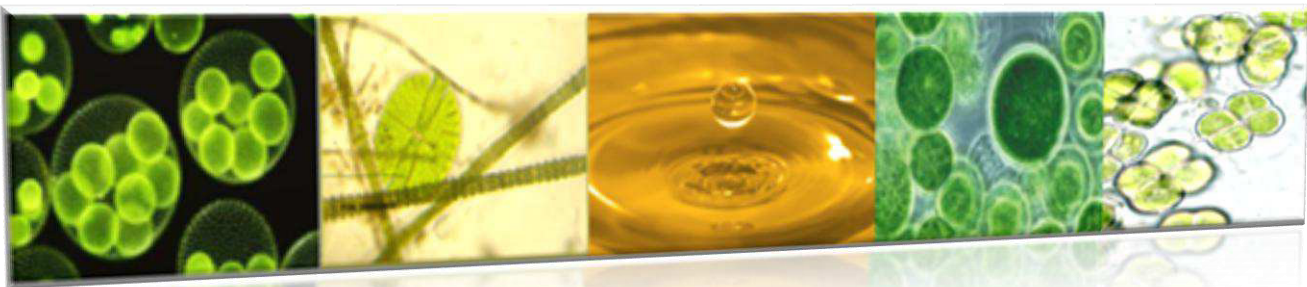
Authoress: Viviane Pereira Tibúrcio.

Advisors: Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo.

ABSTRACT

The search for viable energy alternatives, low cost, sustainable and can replace the use of fossil fuels has increased. In this context, biofuels derived from microalgae become a promising option either from the economic point of view as from the environmental point of view. The cultivation of microalgae produce higher amount of biomass in a short time and require large areas for their production as with sugarcane used for ethanol production, or soybean in the case biodiesel. This study aimed to characterize the potential for production of fatty acids from microalgae isolated from the semiarid region of the state of Paraíba kept growing in monospecific cultures of microalgae bank of LARBIM / UFPB and select potentially producing species of these compounds in order to grow them different stress conditions in order to increase the final yield of the fatty acids of interest for biodiesel production. The cultures were developed using the means Zarrouk and toilet in a growth chamber at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ equipped with lighting system, with a photoperiod of 12 hours. 12 strains included representatives of groups of cyanobacteria and green algae were studied in seven species. The quantification of each fatty microalgae studied acids was determined by gas chromatography. Two species *Pediastrum tetras* (D121WC) and *Scenedesmus acuminatus* (D115WC) showed levels of fatty acids 802.1% compared to 211.1% in soybeans compared to soybean, respectively. Therefore these species were grown under different conditions of stress under the same conditions of temperature and photoperiod, using photic, thermal and nutritional stresses. At the end of each experiment were determined for each condition tested, the levels of proteins, lipids and carbohydrates. The growth curves were avidly by measuring in vivo fluorescence in triplicate, and all growth parameters were analyzed for each species tested. Observed a higher rate of cell division per day in D112Z (0.71 divisions / day) species. The levels of fatty acids in strain D121WC increased more than twice on condition of photic stress. As for the species D115WC was an increase in the yield of fatty acid to condition it to heat stress of 590.8% compared to soybean. Although the two potentially important for the production of biodiesel tested species (*Pediastrum tetras* and *Scenedesmus acuminatus*) are, it is evident that their physiological responses to stress conditions are not the same.

Keywords: biodiesel; microalgae; *Pediastrum tetras*; *Scenedesmus acuminatus*.



Capítulo I
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Estudos voltados para biotecnologia utilizando as microalgas vêm ganhando destaque nos dias atuais em função da capacidade que esses organismos têm de produzir uma ampla variedade de metabólitos como proteínas, lipídeos, carboidratos, carotenóides ou vitaminas, com ampla aplicação para a saúde humana, produção de alimento, aditivos alimentares, cosméticos e produção de energia (UKELESS, 1976; BOROWITZKA, 1999; DEL CAMPO et al 2007; PRIYADARSHANI ; RATHFOR, 2012).

Segundo Cardozo et al. (2007), outros interesses incluem também a produção de fármacos diversos, fonte de novas enzimas, biofertilizantes, inseticidas verdes e usos em programas de bioremediação, a exemplo do tratamento de águas residuais, e em projetos de MDL(Mecanismo de Desenvolvimento Limpo), que hoje se constituem no principal mecanismo mundialmente adotado para reduzir as em emissões de CO₂ na atmosfera e minimizar os efeitos do aquecimento global, devido à enorme capacidade que tais organismos apresentam para retirar CO₂ da atmosfera. Chisti (2007), explica que na produção de 100 toneladas de biomassa algal são assimiladas aproximadamente 183 toneladas de dióxido de carbono, evidenciando assim a alta eficiência com que as microalgas convertem carbono inorgânico em compostos orgânicos através da fotossíntese (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010).

Admite-se que os primeiros estudos sobre cultivos de microalgas tenham se iniciado com o trabalho do Cohn (1850) que manteve uma cepa de *Haematococcus* viva em laboratório, mas este autor não isolou a espécie e nem preparou um meio de cultura específico para tal finalidade, de modo o primeiro relato sobre a necessidade de sais inorgânicos para o desenvolvimento desses organismos em laboratório é atribuído a Famintzin (1871), que decididamente influenciou outros pesquisadores nessa área (LOURENÇO, 2006).

De acordo com Priyadarshani & Rath (2012), o primeiro uso de microalgas por humanos é atribuído aos chineses, que a mais de 2000 anos fizeram uso de *Nostoc* para sobreviver durante épocas de fome. Também há referencias de que os nativos do Chade, África, alimentavam-se de *Spirulina* em períodos de escassez de alimentos, assim como há registros de que no lago Texcoco, México, os Astecas também se alimentavam de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* spp. (Derner, 2006).

Microalgas são organismos fotossintetizantes que vivem na água doce, marinha, salobra ou em locais úmidos, e em uma vasta faixa de temperatura, ocorrendo, portanto, em todos os ecossistemas da terra e numa grande amplitude de variações ambientais (Mata et al., 2009).

Uma das principais características das microalgas é que elas se constituem num sistema biológico muito eficiente de conversão da energia solar em biomassa. Apresentam um ciclo de vida muito curto, com até quatro divisões celulares por dia, segundo (MIRANDA et al., 2013), o que as tornam muito eficientes na produção de grande quantidade de biomassa em pouquíssimo tempo. Além disso, comparando-se com a agricultura tradicional os cultivos desses microrganismos não provocam impactos ambientais, pois podem ser desenvolvidos em pequenas áreas, não competindo, portanto, com os plantios extensivos de oleaginosas convencionais (KOWALSKI, 2010), bem como necessitam apenas de luz solar e dióxido de carbono (CO₂) para a realização da fotossíntese, além, evidentemente, de suplementos nutricionais.

O cultivo pode acontecer de várias formas, em sistemas com poucos e até bilhões de litros de água, dependendo da sua finalidade e interesses na obtenção de biomassa. Mas a grande parte da produção realizada hoje utiliza sistemas poucos sofisticados e é feita a céu aberto em condições ambientais naturais, utilizando tanques rasos construídos de concreto, fibra e policarbonato, com fundo de terra ou revestidos com material plástico (KOWALSKI, 2010).

Dois grandes grupos de microalgas podem ser citados por abrigarem importantes espécies como *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris*, que podem ser utilizadas em diversos processos biotecnológicos: as cianobactérias (ou Cyanophyta) e as clorófitas (Chlorophyta). Mas outros grupos também abrigam importantes espécies, a exemplo das diatomáceas (Bacillariophyta) e dinoflagelados (Dinophyta) *Nitzschia* e *Noctiluca* respectivamente.

As cianobactérias, também denominadas de algas azuis, podem se desenvolver tanto em água doce como no ambiente marinho e em estuários. Algumas espécies são extremófilas, podendo ser encontradas em fontes termais e em ambientes hipersalinos. Outras vivem em solos úmidos e até mesmo desérticos, ou recobrimo muros e paredes úmidos, sendo, portanto, um problema para a manutenção de construções históricas (FRANCO et al., 2013).

A reprodução das cianobactérias ocorre de forma assexuada por brotamento ou fragmentação. Possuem estrutura de uma bactéria, mas com uma considerável

diversidade morfológica. São seres unicelulares podendo ocorrer individualmente ou agrupadas em colônia, na qual grande parte encontra-se envolvida por mucilagem. Muitas cianobactérias podem ser cultivadas em meio contendo diversas fontes de carbono como glicose ou acetato (LOURENÇO,2006).

Segundo a literatura, as cianobactérias são seres fotossintetizante ricas em clorofila-a, sendo também dotadas de outros tipos de pigmentos proteicos solúveis em água, muito importantes para a indústria alimentícia como corantes naturais (CALIJURI et al.,2006). Estes autores consideram, ainda, que algumas espécies são fixadoras de nitrogênio atmosférico, processo este que é feito por meio de células diferenciadas denominadas heterocistos, sendo o nitrogênio fixado transferido para o interior das células vegetativas.

As clorofíceas ou algas verdes também são encontradas em diversos tipos de habitats, incluindo rios, lagos, charcos, estuários, ambiente marinho, e até mesmo em habitats extremos sobre a neve, e folhas de plantas, em desertos secos e sobre cinzas vulcânicas. Apesar de toda essa variedade de ambientes, a maioria das espécies encontra-se em água doce. São organismos unicelulares com células isoladas ou que podem formar colônias de variados tamanhos e formas. A reprodução pode acontecer de forma sexuada ou assexuada por brotamento (LOURENÇO, 2006).

As clorofíceas são fotossintetizantes dotadas de clorofila **a** e **b**, carotenóides e xantofilas, e sua principal reserva é o amido. Esses microrganismos conseguem adquirir carbono por meio da fotossíntese assimilando substâncias inorgânicas do meio. Entretanto, algumas espécies também utilizam matéria orgânica dissolvida na forma de açúcar, apresentando assim um quadro de osmotrofia e mixotrofia (YANG et al., 2000).

Conforme já referido, as microalgas produzem inúmeros compostos de interesse biotecnológico, alguns deles de elevado valor de mercado, sendo importantes em diversas aplicações industriais, mas o grande **boom** do momento é a produção de biocombustíveis de microalgas, em especial o biodiesel.

Os biocombustíveis vêm ganhando destaque na pesquisa científica, apesar da descoberta das grandes reservas de óleo e gás do Pré-Sal, permitindo-se identificar, a partir desses dados, que as fontes fósseis de energia ainda permanecerão em alta economicamente por um bom tempo. No entanto, existe uma preocupação com o impacto ambiental e as alterações atmosféricas decorrentesdo uso dos combustíveis fósseis. Frente a essa problemática, o incentivo pela busca por fontes alternativas de energia vem ganhando grande espaço, a exemplo do biodiesel (PICARDO, 2012), que

normalmente é produzido a partir de óleos vegetais extraídos de sementes oleaginosas como soja, mamona e canola, ou de gordura animal (KOWALSKI, 2010).

Entretanto, para atender às demandas crescentes de mercado extensas áreas de plantio desses vegetais são necessárias, de maneira que haverá cada vez mais exigência de solo fértil e de água doce para os cultivos dessas oleaginosas. Essas práticas podem comprometer a produção alimentícia e aumentar a competitividade entre o uso humano e a indústria, além dos problemas associados com sazonalidade das safras, impactos de estoques, e cenários climáticos mundiais (MURPHY et al., 2011).

Frente a esses conflitos, o cultivo de microalgas mostra-se como uma atividade alternativa muito promissora, visto que é possível produzir grande quantidade de biomassa e gerar biodiesel em águas impróprias para consumo humano ou industrial (por exemplo, em água com diferentes níveis de salinidade) onde muitas espécies apresentam taxas de crescimento bastante favoráveis quando comparadas aos cultivos agrícolas. (PICARDO, 2012).

As microalgas capturam CO₂ e produzem, por meio da fotossíntese, diversos compostos de interesse biotecnológico, a exemplo dos ácidos graxos que podem ser usados para a produção de biodiesel, bioquerosene e como substâncias nutraceuticas como os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e ômega 6; macromoléculas de alto valor agregado como pigmentos (ficocianina, ficoeritrina, betacaroteno, astaxantina, cataxantina) que podem ser usados como corantes em alimentos, agentes antioxidantes ou na indústria farmacêutica (produção de vitamina A) como alguns carotenoides, sem contar ainda que podem ser desenvolvidos cultivos com meios alternativos preparados a partir de resíduos de processos industriais e adição de CO₂ (cultivos autotróficos) ou resíduos orgânicos (cultivos heterotróficos). (PITTMAN *et al.* 2011).

Quando comparadas com outras oleaginosas (**Tabela 1**) evidencia-se que as microalgas têm um alto teor de matéria graxa demonstrando a sua importância na produção de biodiesel.

Tabela 1. Comparação do rendimento em óleos de microalgas com o rendimento por algumas oleaginosas.

Matéria-prima	Teor de óleo (%)	Produtividade em óleo (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)	Área necessária (m ² .ano ⁻¹ .Kg ⁻¹)	Produtividade em biodiesel (Kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Pinhão- Manso	28	741	15	656
Canola	41	1.190	12	862
Mamona	48	1.307	9	1.156
Palma	36	5.366	2	4.747
Microalga	70	136.900	0,1	121.104

Fonte: ADAPTADA DE OLIVEIRA *et al* 2013.

Quer na natureza ou em um sistema de cultivo as microalgas aumentam sua biomassa mediante a fotossíntese, mas a produtividade aumenta até certo limite, visto que em altas concentrações celulares a fotossíntese é limitada por efeito de fotoinibição. Mesmo nessas condições as células ainda são capazes de fixar CO₂ e acumular amido ou lipídeos como produtos de reserva visando a sua sobrevivência em condições desfavoráveis ou de estresse (FRANCO, 2013). Tal particularidade fisiológica desperta o interesse para a realização de cultivos em condições de estresse, visando, com isso, produzir desvios no metabolismo celular para aumentar a síntese de produtos de interesse.

Cultivos em condições de estresse (fótico, térmico ou nutricional, por exemplo) podem incrementar a produção de lipídeos ou de outras moléculas de interesse comercial, muito embora com a limitação do crescimento a produtividade geral de biomassa possa diminuir (CHAGAS, 2010).

Além da boa produtividade em óleo na biomassa de algumas espécies de microalgas outros fatores são analisados para a seleção de cepas adequadas à produção de biodiesel, a exemplo da composição em ácidos graxos, capacidade de crescimento em condições ambientais específicas, requisitos de coleta (concentração da biomassa), extração e purificação do óleo, e balanço energético favorável (FRANCO, 2013). O presente estudo teve como principal propósito selecionar espécies potencialmente produtoras de ácidos graxos isoladas da região semiárida do estado da Paraíba e cultivar essas espécies em condições de estresse visando incrementar a síntese e o rendimento final desses compostos com o intuito de subsidiar a produção de biodiesel.



Capítulo II
OBJETIVOS

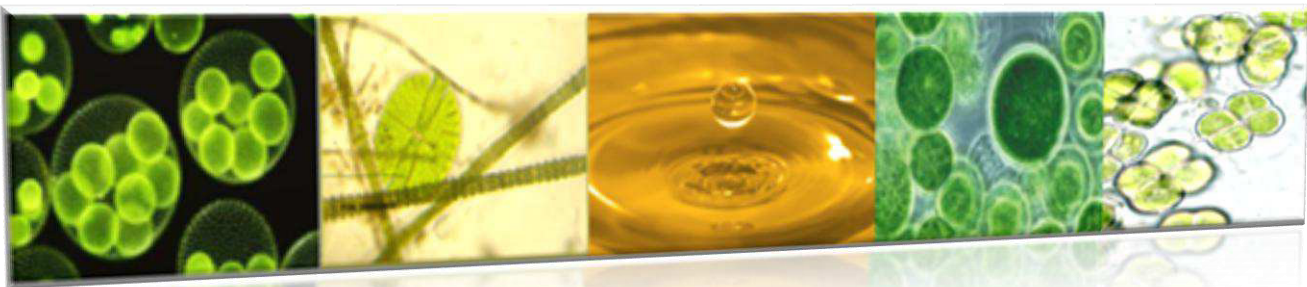
2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Obter cultivos monoespecíficos de microalgas da região semiárida do estado da Paraíba e testar sua capacidade de produção de ésteres metílicos de ácidos graxos visando selecionar espécies potencialmente produtoras desses compostos a fim de cultivá-las em condições de estresse com o propósito de incrementar o rendimento final desses compostos de interesse à produção de biodiesel.

2.2 *Objetivo específico*

- ✿ Selecionar espécies de microalgas do banco de culturas do LARBIM/UFPB isoladas de ambientes aquáticos do semiárido paraibano e cultivar essas espécies em escala de bancada visando analisar parâmetros de crescimento e os teores e a composição de ésteres metílicos de ácidos graxos;
- ✿ Selecionar, dentre as espécies testadas, aquelas que apresentem maiores rendimentos em ácidos graxos em relação à soja (parâmetro utilizado nas análises), e que obedeçam à norma EN14214 da ANP para biodiesel;
- ✿ Cultivar as espécies potencialmente mais produtoras de ácidos graxos em diferentes condições de estresse visando promover desvios metabólicos que possam aumentar a produção de ácidos graxos e outros produtos de interesse como proteínas e carboidrato;
- ✿ Determinar os teores de ácidos graxos, proteínas e carboidrato nas diferentes condições testadas;
- ✿ Relacionar o teor de ácidos graxos ao indicativo lipídico realizado pelo infravermelho médio.



Capítulo III
**FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA**

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Caracterização das microalgas

Microalga é um termo geral que engloba microrganismos unicelulares, filamentosos, coloniais e fotossintéticos, com tamanho usualmente variando entre 2 e 200 μm encontrados em todos os corpos de água do planeta, lugares úmidos, ambientes extremos, sobre solos lamosos, arenosos e rochosos umedecidos, incluindo areias desérticas, e ainda como epífitas, epipélicas, endotélicas, epipsâmicas, endopsâmicas, enquanto outras ainda são encontradas como epi ou endossimbiontes de diversos invertebrados aquáticos, a exemplo dos cnidários, poríferas, tunicados, esponjas, dentre outros (SANTANA, 2014; ARCEO, 2012).

O número total de espécies incluídas neste grupo é controverso, visto que alguns autores admitem um total de 50000 espécies (Richmond, 2004) e outros consideram um número variável entre 40.000 e 100.000 espécies (ABREU, 2010). Algumas estimativas reportam mais de 200.000 espécies apenas para as diatomáceas (*Bacillariophyceae*) (GUIRY, 2012) dados estes que contrastam com as 8000-10000 espécies descritas para este grupo (ARMBRUST, 2009).

O grupo integra representantes do Reino Protista e inclui tanto seres eucariotas pertencentes ao Super-Reino Eucária que são todos aqueles organismos que evoluíram por simbiogênese, como as cianobactérias fotossintetizantes, que pertencem ao Sub-reino Eubacteria do Reino Bacteria, Super-Reino Prokaria, que inclui todos aqueles organismos que evoluíram sem simbiogênese (SHUWARTZ; MARGULIS, 2005).

Nas regiões oceânicas e costeiras as microalgas são os principais produtores primários que asseguram as grandes pescarias nos ambientes mais produtivos. O mesmo acontece em lagos e reservatórios e até mesmo em rios corrediços, onde muitas delas vivem como parte do perifíton.

Estudos apontam que a absorção de gás carbônico pelas microalgas nos oceanos e a transferência da matéria orgânica produzida pela fotossíntese para os fundos dos mares estaria diminuindo os efeitos danosos do aquecimento global produzidos pelos gases do Efeito Estufa. Em escala global, aproximadamente 45 pentagramas de carbono ao ano (Pg C/ano) são fixados através da fotossíntese fitoplântónica (FALKOWSKI ET al., 2000). Este processo, conhecido como Bomba Biológica, gera uma sedimentação

massiva de microalgas que, ao longo de eras geológicas, levou à formação do petróleo que estamos queimando hoje nos motores de nossos carros e indústrias. (ABREU, 2010)

O interesse pelo cultivo das microalgas vem sendo despertado em todo o mundo, isso devido a um leque de aplicabilidade em diferentes áreas econômicas como tratamento de água, fármacos, nutrição e geração de energia (KOWALSKI, 2010). As células desses microrganismos possuem uma composição bioquímica bem diversificada (carboidrato, proteína, lipídios, ácidos graxos, entre outras), os quais estão relacionados não apenas com a natureza de cada espécie, mas também com fatores ambientais como a região onde a mesma foi coletada, as condições na qual o cultivo está sendo realizado, bem como o meio de cultura utilizado (CARDOSO et al, 2011). A **Tabela 2** ilustra a composição bioquímica de determinadas cepas de microalgas cultivadas por Guimarães (2012) com e sem adição de nitrogênio no meio, evidenciando que a ausência desse elemento resulta em variação lipídica.

Tabela 2: Conteúdos dos principais componentes químico das espécies *Clorellavulgaris*, *Clorellaemersonii*, *Chlorellaprotothecoide* e *Chlorellaminutissima*.

Composição bioquímica	<i>Clorella vulgaris</i>		<i>Clorella emersonii</i>		<i>Chlorella protothecoides</i>		<i>Chlorella minutissima</i>	
	Controle	Carência N	Controle	Carência N	Controle	Carência N	Controle	Carência N
Proteína (%)	29 ± 2,5	7 ± 1,6	32 ± 2,9	28 ± 3,8	38 ± 3	36 ± 3	24 ± 3,1	9 ± 2
Glicídios (%)	51 ± 2	55 ± 3,2	41 ± 2,5	11 ± 2,2	52 ± 2,3	41 ± 3	42 ± 3,5	14 ± 2,1
Lipídios (%)	18 ± 2,1	40 ± 2,1	29 ± 2,5	63 ± 1	11 ± 3,2	23 ± 1,2	31 ± 3,2	57 ± 2,5

Fonte: ADAPTADO GUIMARÃES, 2012.

Este resultado é bastante interessante uma vez que, para a produção de biodiesel a matéria prima deve ser rica em ácidos graxos. Nas microalgas geralmente o óleo é encontrado na forma de triacilglicerídeos podendo ser convertido em ésteres metílicos de ácidos graxos (PEREIRA et al 2012; MENEZES et al 2013). Isso explica o porquê das microalgas serem consideradas excelentes em relação a outras culturas para produção de energia.

Outras características importantes das microalgas incluem sua grande eficiência fotossintética quando comparadas às plantas terrestres em termos de produtividade por unidade de área; sua grande capacidade de remover dióxido de carbono por área de cultura ocupada; sua grande capacidade de sintetizar e acumular grande quantidade de lipídeos, alcançando em média de 20 a 50% do peso seco de biomassa, mas podendo chegar a mais de 80% em algumas espécies; seu rápido crescimento e ciclo de vida

muito curto; a facilidade de serem cultivadas em meio líquido; sua versatilidade em poder ser cultivada em diferentes tipos de águas, seja doce, salobra e salgada e também em efluentes e águas residuais; o fato de poderem ser cultivadas em terrenos não apropriados para a prática da agricultura convencional, como salinas, áreas desérticas, etc. de maneira que cultivos de microalgas não competem com áreas para produção de alimento, e finalmente, o fato delas apresentarem um ciclo de colheita muito rápido, permitindo colheitas contínuas ao longo do ano (SEMIÃO, 2013).

3.2-Cultivo de microalgas

Para o cultivo de microalgas é de extrema importância que haja a presença de alguns fatores como luz, nutrientes e temperatura ideais. Com todas essas condições ao inocularmos uma população de uma determinada cepa em um meio de cultura elas dobram a sua biomassa em um período de 24 h ou menos, e na fase de crescimento exponencial poderão completar um ciclo de vida dentro de 3 a 5 horas (SEMIÃO, 2013).

Na fase exponencial encontram-se proteínas e nitrogênio total em abundância, ou seja, quando os nutrientes do meio de cultura estão em excesso, mas, usualmente, essas concentrações diminuem ao chegar à fase estacionária (CHAGAS, 2010). A determinação das curvas de crescimento é o método mais aplicado para se avaliar o comportamento das microalgas em cultivo visto que através delas pode-se relacionar o aumento da biomassa ou do número de organismos num determinado volume (densidade celular) no decorrer do tempo (DERNER, 2006). Em experimentos de bancada usando sistemas fechados sem renovação de meio a curva de crescimento apresenta seis fases distintas como mostradas na (**Figura 1**) a seguir, sendo que cada uma dessas fases apresenta as seguintes características:

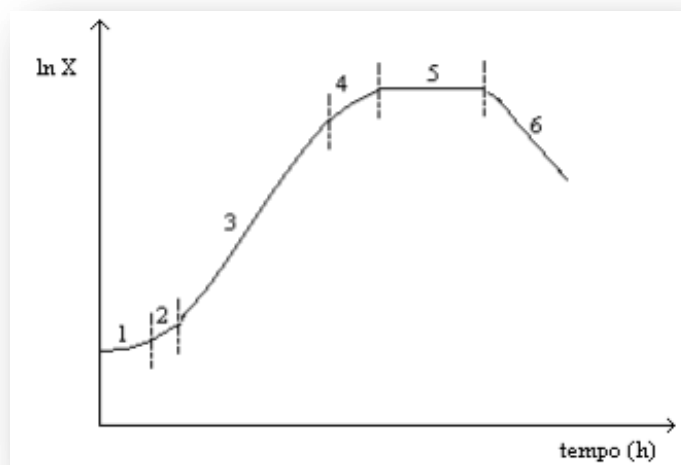


Figura 1. Variação da biomassa em uma cultura descontínua

Fonte: RUSSO (2011)

1. Fase de adaptação (Fase Lag) ($\mu = \mu_d$, em que μ_d representa a taxa de morte): é uma fase de adaptação das células retiradas de uma cultura em fase exponencial ou estacionária para um meio novo; esta fase é extensa na presença de tóxicos, de nutrientes dificilmente metabolizáveis ou se o inóculo for pequeno (RUSSO, 2011).
2. Fase de aceleração do crescimento ($\mu < \mu_{máx}$): é a fase na qual as células começam a multiplicar-se; a taxa específica de crescimento é menor do que valor máximo.
3. Fase de crescimento exponencial ($\mu = \mu_{máx}$): Período de crescimento acelerado, nesta fase a taxa específica de crescimento encontra-se constante, chegando ao seu valor máximo.
4. Fase de desaceleração do crescimento ($\mu < \mu_{máx}$): aqui a concentração dos nutrientes, tornará limitante o cultivo e como consequência ocorrerá um decréscimo da taxa específica de crescimento.
5. Fase estacionária: nesta fase o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pela acumulação de produtos inibitórios do metabolismo; a velocidade de crescimento diminui e se iguala a taxa de morte ($\mu = \mu_d$). A biomassa pode se manter constante à custa da utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido ao rompimento de outras células (RUSSO,2011).
6. Fase de morte: a morte acontece quando todos os nutrientes da cultura de microrganismos são consumidos. A cinética de morte é equipotente a uma reação de

primeira ordem, onde a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de biomassa, ou seja, ao tempo em que os nutrientes diminuem a multiplicação de células e a concentração de biomassa também diminuem. (DERNER, 1995, 2004; DERNER et al., 2006).

3.3 Fatores limitantes ao crescimento das microalgas

As microalgas podem ser cultivadas tanto em sistemas abertos como em sistemas fechados, porém independentemente de qual seja o método de cultivo inúmeros fatores podem influenciar no rendimento final em biomassa e na sua composição bioquímica. Destacam-se entre eles, o pH, a temperatura, a luminosidade, as taxas de aeração, os teores de nutrientes, e a salinidade, principalmente.

O pH necessita de um olhar frequente especialmente no preparo dos meios de cultivo, visto que alguns compostos presentes nas formulações dos meios de cultivo podem se cristalizar e assim precipitarem, tornando-se indisponíveis, ou reduzindo sua disponibilidade para a microalgas. O ideal é que se tenha um pH próximo do neutro visto que assim os componentes do meio de cultura poderão ser absorvidos pelas microalgas (SCHMIDT, 2007; LOURENÇO, 2006). Entretanto, isso vai depender da microalga que está sendo cultivada, visto que existem espécies que também tem predileção por meios com pH ácido, bem como espécies que preferem meios mais alcalinos.

As microalgas consomem bastante CO₂ dissolvido na água durante o seu crescimento, elevando assim o pH da cultura. Já a redução do pH pode ser alcançada com o aumento da disponibilidade de CO₂, mas em consequência pode haver diminuição no crescimento em algumas espécies (OLIVEIRA, 2013). Uma forma alternativa de controlar o pH é o uso de tampões, muito embora para a produção de biomassa em grande escala isso não seria interessante do ponto de vista econômico, uma vez que o uso de tais soluções encareceria os cultivos. As variações de pH podem ser controladas a partir da aeração dos cultivos, injetando ar atmosférico (0,03% de CO₂) ou ar enriquecido com CO₂ em concentração adequada para cultivar uma determinada espécie (LOURENÇO, 2006).

A temperatura é um dos fatores responsáveis pela alteração da taxa metabólica dos organismos vivos. Estudos mostram que não se deve usar a mesma temperatura para todos os tipos de microalga, pois o metabolismo celular varia de espécie para espécie,

independente da região. Usualmente, em cultivos laboratoriais trabalha-se com temperaturas constantes, pois assim encontra-se mais estabilidade nos experimentos o que permite maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies nas condições de cultivo. Entretanto, segundo Lourenço (2006), não é fácil manter constante a temperatura em cultivos de larga escala, mesmo com o uso de sistemas de refrigeração acoplados.

Para a manutenção das espécies é necessário manter uma temperatura em torno de 18 a 22°C (MACEDO, 2001), mas isso depende da região onde os cultivos são desenvolvidos. No Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), por exemplo, as culturas são mantidas a 25°C ($\pm 1^\circ \text{C}$) visto ser esta uma temperatura que se aproxima mais da temperatura média da região, uma vez que a maioria das espécies depositadas no banco de culturas de microalgas da UFPB são cepas regionais e locais.

Cultivos efetuados em temperaturas mais elevadas daquela na qual as cepas são mantidas tem o propósito de ativar a taxa de crescimento das espécies, evidentemente desde que se conheçam os limites de tolerância térmica de cada espécie (SCHMIDT, 2007). Entretanto, a temperatura ideal varia bastante de acordo com a espécie, podendo-se esperar taxas fotossintéticas e absorção de nutrientes mais baixos em temperaturas mais baixas, mas sempre existirão microalgas adaptadas a estas condições que podem atingir taxas de crescimento e remoção elevada de nutrientes desde que as condições de iluminação sejam ideais.

O crescimento das microalgas em condições ideais dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas. As lâmpadas mais comumente utilizadas em cultivos laboratoriais são as fluorescentes do tipo luz-do-dia, por simularem comprimentos de ondas de 350 a 700 nm, necessários para a fotossíntese (OLIVEIRA, 2013). A fotossíntese ocorre na presença da luz muito embora ela aconteça até certo limite denominado de ponto de saturação luminosa, que varia de espécie para espécie.

A aeração é um fator de grande importância nos cultivos, uma vez que ela é responsável pela homogeneização dos nutrientes e manutenção das microalgas em suspensão. O oxigênio é um parâmetro eficaz para o controle fotossintético das microalgas visto que as taxas de oxigênio são diretamente proporcionais à fotossíntese, ou seja, com o aumento da fotossíntese aumenta as taxas de oxigênio na água.

Entretanto, este aumento pode dificultar a fotossíntese devido à fotoxidação, o que pode ocasionar a morte da cultura (BORGHETTI, 2009).

Um cultivo em pequena escala ocorre sem a necessidade de uma aeração, apenas uma agitação manual diária já é suficiente. A aeração mecânica é muito importante especialmente à noite devido à alta taxa de respiração das microalgas, o que pode ser um aspecto importante a considerar, particularmente em culturas velhas onde a quantidade de células senescentes é muito alta, visto que nessas condições a produtividade de oxigênio durante o dia torna-se reduzida. A ausência ou redução da luz, solar ou artificial, diminui a produção de oxigênio, reduzindo também o processo da fotossíntese (BORGHETTI, 2009).

Do ponto de vista nutricional o desenvolvimento dos cultivos está diretamente relacionado à quantidade de nutrientes disponível no meio, assim como a quantidade lipídica produzida por suas células. Na ausência de alguns nutrientes pode ocorrer alteração fotossintética diminuindo a concentração de clorofila, tornando-se assim bem menor a produção de biomassa (PENTEADO, 2010).

O nitrogênio (N_2) é um composto fundamental para formação de proteínas, ácidos nucleicos e ficobiloproteínas, podendo ser encontrado em diferentes concentrações no interior das células e influenciando o metabolismo primário de determinadas substâncias; a falta de nitrogênio usualmente leva a um acúmulo de lipídios (DZUMAN, 2013). Estudos revelam que esse acúmulo lipídico está diretamente ligado a quantidade de nitrogênio no cultivo. Isso porque a redução de nitrogênio conduz o metabolismo das microalgas que antes estava direcionado à multiplicação celular, para a produção dos compostos reserva, a exemplo dos ácidos graxos saturados, prevenindo a célula de um período de privação nutricional (XU *et al.*, 2012). Permitindo o aumento das taxas lipídicas celular, a falta do nitrogênio transforma paulatinamente a composição dos lipídios, de ácidos graxos para triglicérides (WIDJAJA *et al.*, 2009).

O carbono é o composto orgânico mais importante sintetizado pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, entre outros). Por isso a necessidade das algas por um maior consumo dessa substância. Quanto maior a velocidade de crescimento das microalgas mais rápido será o consumo do carbono disponível no meio (o que faz com que ele seja um fator limitante para a multiplicação celular), resultando em aumento do pH no cultivo, no caso do meio de cultivo não ser tamponado (LOURENÇO, 2006). O carbono pode ser encontrado no cultivo na forma

de dióxido de carbono (CO_2), ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}).

O fósforo, para ser assimilado pelas microalgas deve estar na forma de fosfato. A deficiência de fósforo no meio de cultivo causa um baixo teor lipídico na célula, diminuindo assim a produção de óleo (LOURENÇO, 2006).

Fosfatos orgânicos em águas naturais normalmente são encontrados em maior concentração do que fosfato inorgânico. Fosfato orgânico é fonte primária de fósforo, sendo hidrolisado por enzimas extracelulares como fosfoesterases ou fosfatases, resultando em fósforo inorgânico. A quantidade de fósforo varia entre espécies, mesmo que não exista fator externo limitante (DEZUMAN, 2013). A ausência de fósforo no meio acarreta grandes alterações no perfil lipídico das microalgas, uma vez que o fósforo faz parte dos fosfolipídios. Logo, a ausência deste nutriente desvia o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos saturados e lipídios neutros, causando a diminuição de ácidos graxos poliinsaturados (OLIVEIRA et al., 2013).

A falta de ferro para as microalgas pode diminuir o crescimento e a concentração de clorofila, sendo que esse composto é fundamental para o crescimento celular e produção de lipídios neutros, obtendo-se, na sua presença, uma estimativa de crescimento de até 56,6% a mais quando comparado com cultivos desenvolvidos sem adição de ferro (LIU et al., 2008). O potássio, por sua vez, é o responsável pelo controle da pressão osmótica, incentiva a respiração em pH reduzido, é cofator de inúmeras enzimas (RUSSO, 2011). A função dos micronutrientes metálicos é de participação nas estruturas enzimáticas assim como na fixação de nitrogênio, fotossíntese, síntese dos ácidos graxos e na respiração. Os elementos que compõe os micronutrientes são: Manganês, Molibdênio, Cobalto, Boro, Zinco e Cobre, e as vitaminas que são usadas nos cultivos densos (LOURENÇO, 2006).

A salinidade pode influenciar o crescimento e a composição de células de microalgas. A salinidade ótima varia de acordo com cada espécie. Em sistemas abertos a concentração de sais dissolvidos na água varia de acordo com as condições do tempo (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010). Em geral, a variação da salinidade pode acarretar alguns efeitos negativos no crescimento dos cultivos devido a estresses osmóticos e iônicos.

3.4 Biodiesel

A busca pela dependência dos derivados fósseis, redução da emissão de poluentes das industriais e dos veículos, controle da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera, são elementos motivadores comuns em quase todo o mundo pelo interesse nos biocombustíveis (LEAL, 2007).

Diante de tais problemáticas, estudos se intensificam visando à busca por combustíveis que possam vir a substituir em parte o petróleo. A mudança do óleo diesel para o biodiesel é benéfica, diante da real possibilidade de redução da emissão de gases poluentes, destacando o CO₂ que é o principal responsável pelo aquecimento global.

O biodiesel é renovável, pouco tóxico, e biodegradável, contrapondo-se assim aos combustíveis derivados de petróleo (MELO, 2007). A composição química do biodiesel é formada a partir de ésteres de ácidos graxos e a sua obtenção ocorre através da transesterificação de triacilglicerídeos, ou da esterificação de ácidos graxos, em presença do álcool monohidroxilado de cadeia curta. (DABDOUB *et al* 2009).

A produção de biodiesel no Brasil ganhou maior atenção na década de 90 graças às pesquisas desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (EMBRAPA). Houve um maior avanço em 2004 com o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB) (OLIVEIRA, 2013). O PNPB considera que o biodiesel está introduzido na matriz energética brasileira legalmente, com a aprovação da Lei nº 11.097 de 2005, que estabelece percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel e o monitoramento da inserção do novo combustível no mercado, como pode ser visto na **Figura 2**.



Figura 2. Percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel.
Fonte: BRASIL ECODIESEL (2008).

As propriedades físico-químicas do biodiesel são equivalentes ao diesel de petróleo e pode suceder combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão do ciclo diesel ou em outros sistemas, como por exemplo, equipamentos para geração de energia elétrica (SCHROEDER, 2013).

A transesterificação é o método utilizado na produção de biodiesel e neste processo ocorre uma reação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com o etanol ou o metanol, sendo que a transesterificação metílica é mais utilizada em todo o mundo, acelerada por um catalisador, que se extrai a glicerina, ésteres de etila (quando o álcool utilizado for o etanol), além de mono e diglicerídeos como intermediários, em uma série de três reações (NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2004).

Realizada a reação, se faz necessário a purificação do biodiesel que acontece em quatro etapas: decantação, lavagem, filtração e secagem. Os passos do processo da transesterificação estão expostos no fluxograma da **Figura 3** a seguir:

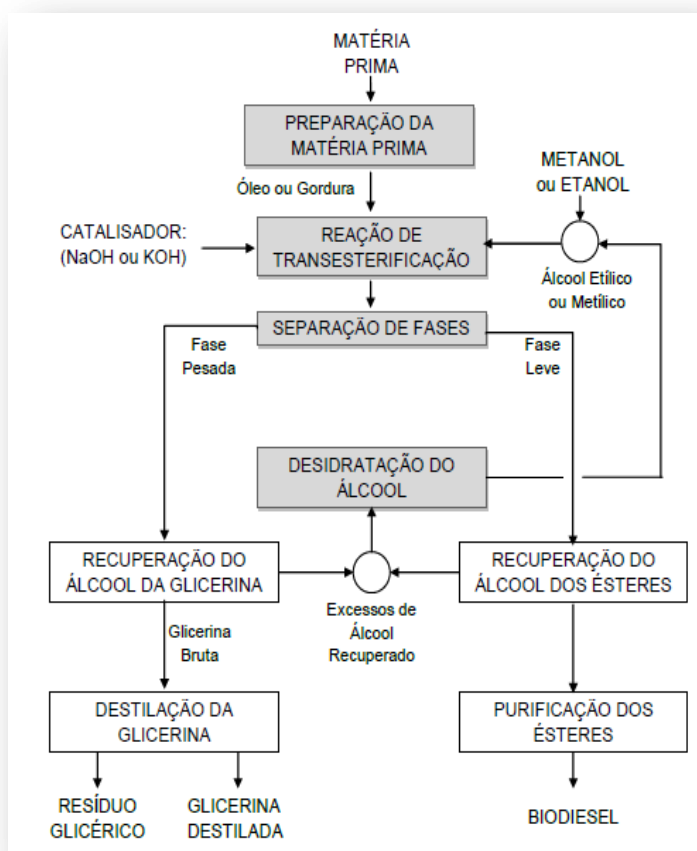


Figura 3. Fluxograma do processo de produção de biodiesel.
Fonte: PARENTE (1999).

3.5 Biodiesel a partir de microalgas

As microalgas são microrganismos com muitas espécies que armazenam grandes quantidades de óleo, sendo bastante indicadas para a produção do biodiesel. Elas apresentam uniformidade de produção o que não acontece com as plantas de grande porte que contém folhas, caule, frutos e raízes os quais serão isolados antes da extração dos ácidos graxos. Além do seu potencial lipídico, outro ponto a ser citado é que quando comparado a outras oleaginosas às microalgas não necessitam de extensas áreas para seu cultivo evitando assim a competição com produções de alimentos para atender à necessidade humana (HUND *et al.*, 2011; MAKAREVICIENE *et al.*, 2011). O óleo extraído da biomassa de microalgas dispõe de características físicas e químicas bem próximas às do biodiesel obtido a partir das biomassas tradicionais, por possuir lipídeos com características semelhantes (CARDOSO *et al.*, 2011).

A variedade lipídica das microalgas pode estar diretamente ligada a biomoléculas que fazem parte da composição celular e que funcionam como componentes estruturais em membranas, fonte de energia, metabolitos e produtos de armazenamento (SEMIÃO, 2013). A composição dos lipídios é, basicamente, o glicerol, açúcares, ou as bases de ácidos graxos esterificados com um número de átomos de carbono variando de C12 a C22 (BECKER, 2004).

Os lipídios neutros como os glicolípidos e fosfolípidos (principais componentes das membranas celulares) são enquadrados aos triglicerídeos (TAG) e ácidos graxos livres (BECKER, 2004). Microalgas de água doce são ricas em ácidos graxos insaturados (50-65%), em particular os ácidos palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), bem como uma porcentagem considerável de ácido palmítico (C16:0) da ordem de 17 a 40% (SEMIÃO, 2013).

A produção de biodiesel a partir do óleo das microalgas se dá pelo processo da transesterificação via catálise ácida ou básica, na presença de um álcool (MENEZES *et al.*, 2013), embora possa também ser efetuada por outros processos como transesterificação ou esterificação com metanol ou etanol (SUAREZ; MENEGETTI, 2007) nem sempre viáveis economicamente, uma vez que a matéria-prima graxa é usualmente de alto custo (MENEZES *et al.*, 2013). O organismo microalgal produz de

25 a 220 vezes mais triacilglicerídeos quando comparado a oleaginosas terrestre. (TAHER, 2013).

Estudos revelam que biodiesel produzido a partir de microalgas de água doce possuem uma melhor qualidade em propriedades físico-químicas, mas é importante levar em consideração que o perfil lipídico pode ser influenciado de acordo com as condições de cultivo (MENEZES *et al* 2013). Contudo, inúmeras pesquisas buscam selecionar espécies de microalgas que possuam um bom rendimento em ácidos graxos e que tenham preferencialmente uma combinação de ácidos saturados e monoinsaturados, com um teor de ácidos com duas ou mais duplas ligações reduzidas, o que leva à um biodiesel com uma boa estabilidade oxidativa (MENEZES *et al* 2013).

Além das inúmeras vantagens citadas, um outro ponto positivo da produção de bioiesel a partir de microalgas é quando se fala economicamente. Franco, 2013 mostrou em seus estudos que pesquisas realizadas na Virginia Polytechnic Institute and State University (EUA) usaram quando utilizaram glicerol bruto derivado de usinas de biodiesel como fonte de carbono de baixo custo para o cultivo heterotrófico da espécie *Schizochytrium limacinum*, possibilitando a produção de biodiesel a partir de microalga. Observando uma produção de baixo custo, produzindo biodiesel de qualidade, obtendo um bom rendimento e com a possibilidade de fechar um ciclo ao utilizar o principal coproduto da indústria de biodiesel.

Mais uma grande vantagem quando comparado a biodiesel produzido a partir de comodites agrícolas é a análise do custo avaliando a disponibilidade de matéria prima, levando em conta a competição com outros mercados que enfrentará, inclusive com a própria alimentação humana. Implicando em um alto custo de oportunidade do óleo como fonte de matéria-prima para o biodiesel (BARROS *et al.*, 2006).



Capítulo IV
METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos cultivos, ensaios de produção de biomassa e análises de ácidos graxos

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM), da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa, Campus 1.

As espécies de microalga estudadas foram isoladas de diferentes tipos de ambientes aquáticos da região semiárida da Paraíba (açudes, barreiros, tanques de dessedentação de animais e rios temporários), a partir de coletas efetuadas com garrafas pet, sendo o material armazenado em caixas de isopor durante seu transporte ao Laboratório. As amostras coletadas foram inoculadas em frascos de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura sintético Zarrouk (ZARROUK, 1966) e WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), conforme descritos nas tabelas 3 e 4, os quais foram mantidos em câmara de cultura climatizada a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C com sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia e fotoperíodo ajustado para 12 horas.

Tabela 3. Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Soluções de Trabalho	
Reagentes	Quantidades (g) dissolvida em água destilada
1- KNO ₃	15,0 em 200 ml
2- NaCl	33,0 em 200 ml
3- MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 em 200 ml
4- K ₂ HPO ₄	1,5 em 200 ml
5- CaCl ₂ .2H ₂ O	0,58 em 200 ml
6- Na ₂ EDTA	6,4 em 100 ml
7- FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 em 100 ml
8- H ₃ BO ₃	1,142 em 100 ml
9- Solução mista	*
*Solução mista. Dissolver os cinco sais abaixo (g) em 100 ml de água destilada.	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049g (pode ser substituído por CoCl ₂ .6H ₂ O ou CoSO ₄ .7H ₂ O)
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,144g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0157g
MoO ₃	0,071g (pode ser substituído por NaMoO ₄ .2H ₂ O)
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 .	
B - Na solução anterior, dissolver 2,0 g de Na ₂ CO ₃ .	
C - Acrescentar 10,0 ml das soluções 1, 2, 3, 4 e 5.	
D - Acrescentar 1,0 ml das soluções 6, 7, 8 e 9.	
E - Completar o volume a 1.000 ml e autoclavar.	

Fonte: SANTANA, 2014.

Tabela 4. Composição do meio WC (Guillard; Lorenzen, 1972).

Solução estoque	Fórmula	Quantidade
Cloreto de cálcio 2.H ₂ O	CaCl ₂ . 2H ₂ O	36.8 g
Sulfato de magnésio 7.H ₂ O	MgSO ₄ . 7H ₂ O	37 g
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	12.6 g
Fosfato de potássio 3.H ₂ O	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11.4 g
Nitrato de sódio	NaNO ₃	85 g
Água destilada		1 L
Solução de silicato	Fórmula	Quantidade
Metasilicato de sódio 9.H ₂ O	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	21.2 g
Água destilada		1 L
Solução de micronutrientes	Fórmula	Quantidade
Sal dissódico	Na ₂ EDTA	4.36 g
Cloreto férrico 6.H ₂ O	FeCl ₃ . 6H ₂ O	3.15 g
Sulfato de cobre 5.H ₂ O	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.01 g
Sulfato de zinco 7.H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 g
Cloreto de cobalto 6.H ₂ O	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.01 g
Cloreto de manganês 4.H ₂ O	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.18 g
Molibdato de sódio 2.H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.006 g
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	1 g
Água destilada		1 L
Solução de vitaminas	Quantidade	
Tiamina HCl	0.1	
Biotina	0.0005	
Água destilada	1 L	
Composição do meio	Quantidade	
Solução estoque, Solução de silicato, Solução de micronutrientes e Solução de vitaminas: usar 1mL a cada litro de meio.		
Tri(hidroximetil)-amino metano	0.115 g a cada litro de meio	

Fonte: SANTANA, 2014.

Os meios de cultura foram preparados com água destilada e autoclavada e deixada em repouso por 24 horas em temperatura constante para reoxigenação, adicionando-se em seguida todos os macronutrientes, micronutrientes e vitaminas presentes nas suas respectivas formulações. Ao se constatar crescimento de células as cepas foram isoladas em microscópio bionocular LEICA, transferindo-as para tubos de ensaio com meio de cultura usando microcapilares. Reisolamentos sucessivos foram efetuados por esta técnica, até que cultivos monoespecíficos fossem obtidos. As cepas isoladas foram codificadas e incorporadas ao banco de microalgas do LARBIM/UFPB, sendo os cultivos mantidos mediante repicagens mensais. A identificação das espécies foi feita mediante o uso de bibliografias especializadas e buscas na internet, usando critérios morfológicos, conforme descrito em SANTANA (2014).

Ensaio de produção de biomassa foram realizados na câmara de cultivo acima referida, com cada uma das cepas isoladas nos seus respectivos meios de cultura. No total foram testadas 16 espécies, cujos cultivos foram acompanhados diariamente por

medidas da fluorescência *in vivo* das amostras e/ou por contagens celulares. Antes da realização dos ensaios de produção de biomassa cada cepa selecionada foi otimizada adicionando-se um inoculo em um balão de 250 ml, o qual foi mantido na câmara de cultivo do LARBIM até que entrassem em fase exponencial quando alíquotas de cada cultivo foram transferidas para balões de 6L contendo 5L de meio de cultura, mantendo-se os inoculos iniciais na ordem de 5000 a 20000 células.mL⁻¹.

Os experimentos foram acompanhados através da medida da fluorescência “*in vivo*” usando um fluorômetro Turner Design, modelo 10005R, e por meio de contagens celulares em microscópio binocular Leica, em câmaras de Fuchs-Rozenthal para as células mais diminutas e com câmara de Sedgwick-Rafter, para as formas filamentosas. Os ensaios foram interrompidos no início da fase estacionária, a biomassa produzida foi centrifugada em centrifuga refrigerada (-18° C), congelada em *ultrafreezer* (-30° C) e em seguida liofilizada. O rendimento final em biomassa seca (g.L⁻¹) foi anotado para cada espécie procedendo-se em seguida a análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos em cromatógrafo a gás, conforme procedimentos de Menezes et al. (2013).

4.2 Ensaio em condições de estresse com cepas selecionadas

Dentre a totalidade de espécies testadas no item 4.1 foram selecionadas duas espécies que se mostraram mais promissoras para a produção de biodiesel, quais sejam a cepa D121WC (*Pediastrum tetras*) e a cepa D115WC (*Scenedesmus acuminatus*), ambas isoladas do município de Frei Martinho, região do curimataú paraibano, sendo que ambas são mantidas no banco de cultura do LARBIM/UFPB em tubos de ensaio com meio de cultura, à temperatura de 25°C±1° C e nas mesmas condições fóticas através de um sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia com fotoperíodo de 12 horas.

Os seguintes experimentos em condições de estresses foram realizados: a) estresse térmico, realizado em câmara de germinação Marconi com fotoperíodo de 12 horas e iluminação de 216,22 μmol fotóns .m⁻² s⁻¹, com as duas espécies selecionadas, mantendo-se para cada uma delas, 4 balões à temperatura de 25° ± 1°C até a fase exponencial e ao atingir esta fase dois balões foram mantidos nesta temperatura e os outros dois foram transferidos para 30° C (choque térmico de 5° C na fase exponencial até a estacionária quando o experimento foi interrompido); b)- estresse nutricional, desenvolvido com a cepa D121WC em câmara de cultura com fotoperíodo de 12 horas e

iluminação de $391,89 \mu\text{mol fotons.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ usando quatro balões de 6 litros com 5 litros de meio de cultura WC até a fase estacionária onde dois balão foram interrompidos, e aos outros dois foram adicionados todos os nutrientes do meio WC sem nitrogênio (deprivação N_2). A interrupção dos ensaios ocorreu 3 dias depois dessas adições; c)- ensaios de estresse fótico, realizado com a cepa D121WC na câmara de cultivo do LARBIM, a $25^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ usando quatro balões de 6 litros de capacidade com 5 litros de meio de cultura sendo que todos os balões foram mantidos à intensidade luminosa de $182,45 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e no final da fase exponencial, dois balões foram mantidos nesta intensidade luminosa e dois foram transferidos para uma intensidade cerca de duas vezes maior ($391,89\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), sendo os experimentos interrompidos cerca de 3 dias da fase estacionária. Todos os ensaios foram realizados com aeração mediante a injeção contínua de ar a pressão ambiente usando um mini compressor RESUN AOC2. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por medidas da fluorescência “in vivo” usando um Fluorômetro urner Design, modelo 10005R e por meio de contagens celulares em microscópio binocular Leica, usando câmaras de Fuchs-Rozenthal. A biomassa produzida em cada cultivo foi concentrada em centrífuga refrigerada (18°C), congelada a -30°C num ultrafreezer, liofilizadas num liofilizador Terroni e pesada em balança analítica.

Os teores de ácidos graxos de cada amostra, foram determinados no LARBIM/UFPB, gravimetricamente. A metodologia usada nessas análises seguiu o método de Hartman e Lago adaptado para microanálises, conforme procedimentos de Menezes et al., (2013). O indicativo de ácido graxo presente na biomassa foi feito a partir de medidas da relação FT-IR/FT-NIR (infravermelho próximo com transformada de Fourier) usando um espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer modelo Spectrum 400 series. Também foram quantificados nas amostras os teores de carboidrato e de proteína de acordo com a metodologia de Korchet,1978 e Lowry et al., 1951, respectivamente conforme adaptações de Derner et al., (2006) assim como o teor de lipídeo que foi quantificado pelo procedimento Bligh Dyer.



Capítulo V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espécies de microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba e analisadas quanto aos teores e perfil de ácidos graxos

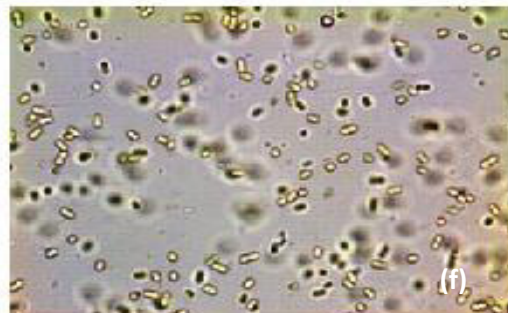
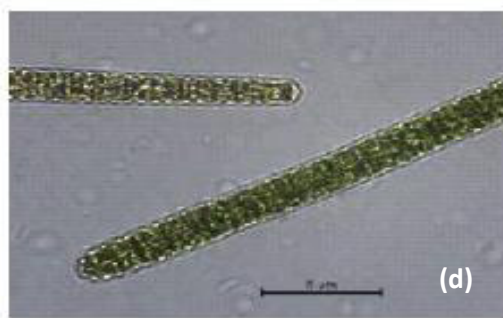
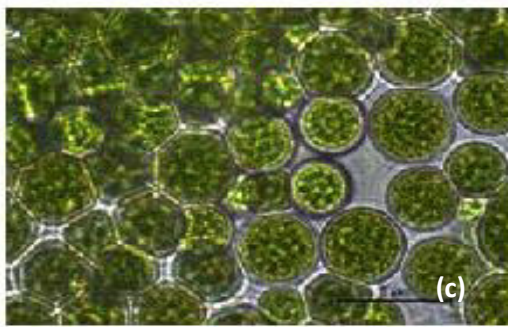
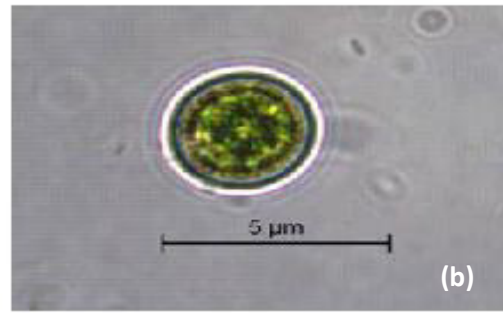
Foram estudadas 12 cepas de microalgas em cultivos monoespecíficos, oriundas de vários tipos de ambientes aquáticos da região semiárida da Paraíba, incluídas em 7 espécies das quais 4 pertencem ao grupo das clorofíceas e 3 são cianobactérias. Dentre as cepas estudadas, 4 são clones da cianobactéria *Synechococcus nidulans* e 3 são clones da clorofícea *Chlorococcum* cf. *hypnosporum* (Tabela. 5). Todas as espécies foram fotografadas em microscópio LEICA DM 2500 e suas respectivas imagens estão agrupadas na Prancha 1.

Tabela 5. Relação das microalgas oriundas da região semiárida da Paraíba utilizadas nos ensaios de produção de biomassa e análises de ácidos graxos. Z = Zarrouk água doce; WC = meio WC água doce, CLO = Clorofícea; CIA = Cianobactéria.

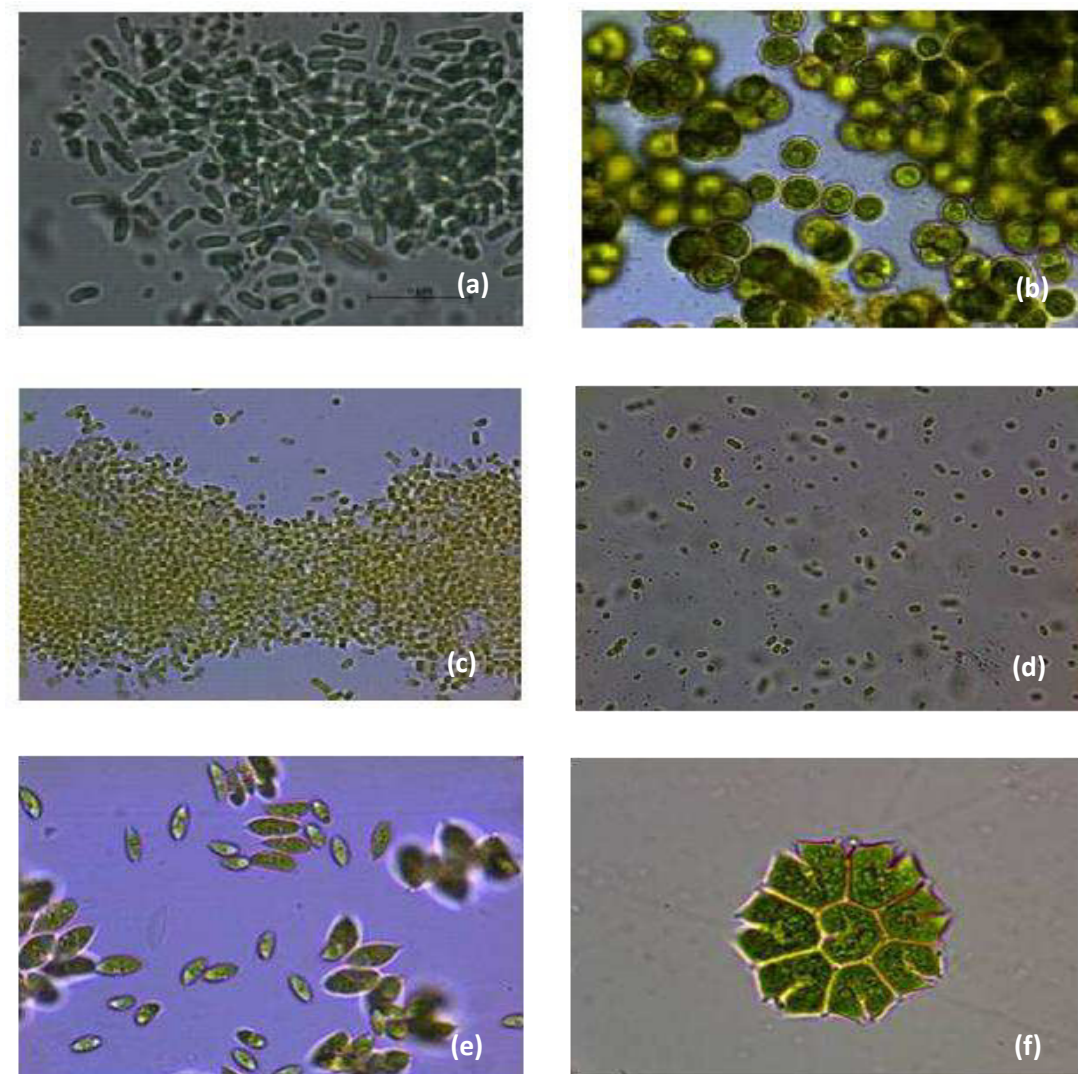
Código	Táxon	Procedência
D26Z	<i>Desmodesmus</i> sp cf <i>costato-granulatus</i> (CLO)	Açude do Cais, Cuité – PB
D28Z	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>hypnosporum</i> (CLO)	Açude do Cais, Cuité – PB
D37Z	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>hypnosporum</i> (CLO)	Açude do Cais, Cuité – PB
D39Z	<i>Oscillatoria tenuis</i> (?)(CIA)	Açude de Acauã, Itatuba – PB
D40Z	<i>Synechococcus nidulans</i> (CIA)	Açude de Acauã, Itatuba – PB
D46Z	<i>Synechococcus nidulans</i> (CIA)	Rio Quinturaré, Frei Martinho-PB
D74Z	<i>Rhabdoderma lineare</i> (CIA)	Barreiro Sacramento, Frei Martinho-PB
D76Z	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>hypnosporum</i> (CLO)	Rio Quinturaré, Frei Martinho-PB
D82Z	<i>Synechococcus nidulans</i> (CIA)	Açude da Quixaba, Frei Martinho-PB
D112WC	<i>Synechococcus nidulans</i> (CIA)	Açude da Quixaba, Frei Martinho-PB
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i> (CLO)	Bebedouro de ovelhas, Frei Martinho-PB
D121WC	<i>Pediastrum tetras</i> (CLO)	Açude Prainha, Frei Martinho – PB

Fonte: Própria.

Prancha I. Microalgas oriundas da região semiárida da Paraíba utilizadas nos ensaios de produção de biomassa e análises de ácidos graxos. Figura a: *Desmodesmus* sp cf *costato-granulatus*, b: *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, c: *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, d: *Oscillatoria tenuis*(?), e: *Synechococcus nidulans*, f: *Synechococcus nidulans*.



Prancha II. Microalgas isoladas de diferentes habitats da região semiárida do estado da Paraíba. Figura a: *Rhabdoderma lineare*, b: *Chlorococcum* cf. *hypnosporum*, c: *Synechococcus nidulans*, d: *Synechococcus nidulans*, e: *Scenedesmus acuminatus*, f: *Pediastrum tetras*.



O rendimento relativo de ácidos graxos de cada uma das microalgas estudadas, determinado por cromatografia a gás, se acha representado na Tabela 8. Pode se evidenciar que os maiores rendimentos de ésteres de ácidos graxos em relação à soja (%) foram encontrados nas cepas D112Z (143,3%), D115WC (211,1%) e D121WC (802,1%), valores estes que qualificam estas microalgas como potenciais para a produção de biodiesel.

Entretanto, ao se observar biomassa total obtida em cada experimento e os teores de ácidos graxos é perceptível a disparidade entre as cepas estudadas visto que o maior rendimento final em biomassa seca (0,75 g/L) foi encontrado na cepa D28Z,

que teve um dos mais baixos rendimentos em ácidos graxos (4,7%), enquanto que as cepas que apresentaram os maiores teores de ácidos graxos apresentaram rendimento em biomassa bem inferior: 0,63 g/L para a cepa D112Z, 0,60 g/L para a cepa D115WC e 0,49 g/L para a cepa D121WC.

Tabela 6. Constante de crescimento k (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g) e totais de ésteres metílicos de ácidos graxos (%) das microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba.

Código da cepa	k (média e desvio padrão)	Duração da fase Log (dias)	Biomassa (g/L)	Rendimento relativo em ésteres de ácidos graxos em relação à soja (%)
D26Z	0,21±0,06	4	0,52	40,93
D28Z	0,32±0,05	2	0,75	4,7
D37Z	0,51±0,25	4	0,49	54,5
D39Z	0,33±0,12	4	0,63	39,0
D40Z	0,41±0,08	2	0,54	9,5
D46Z	0,16±0,01	2	0,38	47,0
D74Z	0,51±0,10	8	0,32	0,5
D76Z	0,30±0,04	2	0,64	60,2
D82Z	0,41±0,06	3	0,39	42,4
D112Z	0,71±0,45	6	0,63	143,3
D115WC	0,60±0,13	4	0,45	211,1
D121WC	0,16±0,03	4	0,49	802,1

Fonte: Própria.

A princípio, é possível indagar que clones da espécie *Chlorococcum* cf. *hypnosporum* (D28Z, D37Z, D76Z) demonstraram uma divergência nos valores médios do k (de 0,49 a 0,64), na quantidade de biomassa (0,30 g/L a 0,51 g/L) e no rendimento de ácidos graxos (4,7% a 60,2%), assim como os clones da espécie *Synechococcus nidulans* (D40Z, D46Z, D82Z e D112Z) que também exibiram uma variação nos valores médios do k de 0,16 a 0,71, na quantidade de biomassa total (0,38 g/L a 0,63 g/L) e no percentual dos ácidos graxos totais (9,5% a 143,3% em relação à soja). Tais resultados sugerem que independente da microalga ser a mesma espécie a adaptação ao meio ou a composição bioquímica não são necessariamente as mesmas, sendo relevante considerar as condições do habitat onde as espécies foram coletadas bem como as condições fisiológicas e metabólicas de cada clone no momento do seu isolamento (SANTANA, 2014).

Por outro lado, do ponto de vista da velocidade de crescimento, constatou-se que os maiores valores de k foram encontrados nas cepas D112Z com 0,71 divisões/dia e

D115WC, com 0,60 divisões/dia, enquanto que o menor valor de k foi encontrado em D121WC (0,16 divisões/dia), justamente a microalga que apresentou o maior teor em ácidos graxos. A cepa que mostrou uma extensa fase exponencial foi a D74Z (8 dias), enquanto que cepas D28Z e D76Z (clones de *Chlorococcum cf. hypnosporum*), D40Z e D46Z (clones de *Synechococcus nidulans*) tiveram uma fase exponencial bem curta, de apenas 2 dias.

É importante mencionar que os teores de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos para as espécies em estudo foram cultivados em condições ideais (fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$). Alguns autores (MIAO; WU, 2004; ROUSCH, 2003; SOLOVCHENKO 2007; CARDOSO et al., 2011) concordam em afirmar que quando os cultivos são desenvolvidos em condições de estresse pode-se esperar um aumento na produção de lipídeos, uma vez que a composição bioquímica das microalgas varia não somente de espécie para espécie, mas também com as condições de cultivo, incluindo fatores externos com a temperatura, intensidade luminosa, salinidade, pH, além da composição dos meios de cultura.

A partir de tais argumentos é que se considerou selecionar as espécies que exibiram os maiores teores de ácidos graxos para a realização de cultivos em condições de estresse, mesmo que não tenham sido elas as que apresentaram as maiores produtividades em biomassa. Foram selecionadas as espécies D121WC (*Pediastrum tetras*), cujo teor de ácido graxo em relação à soja foi 802,1%, e a espécie D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) com quantidade relativa de ácidos graxos de 211,1%, presumindo-se que possíveis estresses nutricional, térmico e fótico poderiam incrementar tais valores.

5.2 Análise bioquímica da espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) submetida a estresse nutricional.

O cultivo de *Pediastrum tetras* sob estresse nutricional teve a duração total de 29 dias, mas o início da fase estacionária ocorreu no 25º dia quando o cultivo foi interrompido em dois balões sendo a biomassa obtida destinada às análises de ácidos graxos (ponto na curva de crescimento), e nos outros dois balões foram adicionados todos os constituintes do meio WC, porém sem N₂ (deprivação de nitrogênio). Após quatro dias nessa condição o experimento foi interrompido e a biomassa obtida foi destinada às análises de ácidos graxos (ponto b da curva de crescimento) (Figura 5).

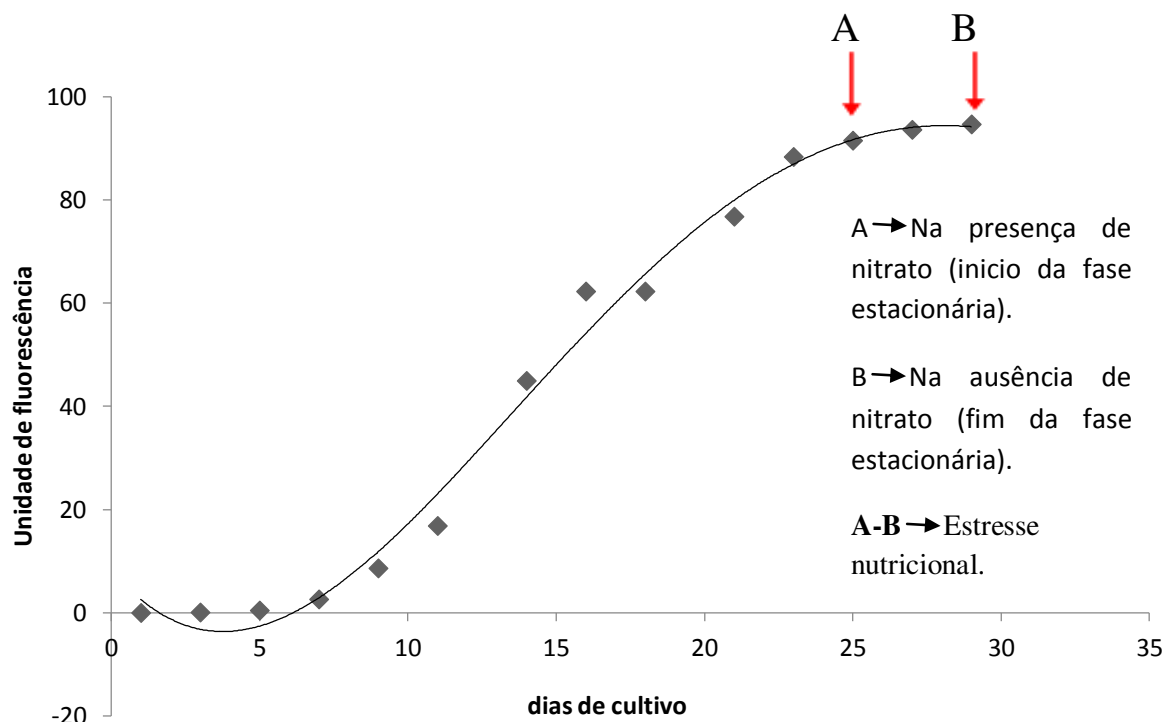


Figura 4. Curva de crescimento da microalga D121WC (*Pediastrum tetras*) em estresse nutricional. Ponto **a** = início da fase estacionária, quando o experimento foi interrompido em dois balões, a biomassa foi colhida e nova adição de todos os nutrientes do meio WC, porém sem nitrogênio (deprivação de N₂) foi efetuada nos outros dois balões. Ponto **b** = final do experimento, quando a biomassa dos dois balões com deprivação de N₂ foi colhida.

Nesta figura, os dados de unidade de fluorescência representam os valores médios dos quatro balões até o 25º dia, e dos dois balões com deprivação de N₂, do 25º dia em diante. A fase exponencial durou do 7º dia ao 14º dia (8 dias), e o valor do *k* (constante de crescimento) nessa fase foi de $0,58 \pm 0,21$ divisões celulares.dia⁻¹ (**Tabela 7**).

Tabela 7. Dados do cultivo sob estresse nutricional obtidos para a cepa D121WC (*Pediastrum tetras*) em condições de laboratório.

Variáveis consideradas	Valores obtidos	
<i>k</i> (média e desvio padrão)	0,58±0,21	
Duração da fase Log (dias)	8	
	No ponto a da curva (início da fase estacionária)	No ponto b da curva (após deprivação de N ₂)
Rendimento celular (cél.s.mL ⁻¹)	$6,72 \times 10^4$	$6,72 \times 10^4$
Biomassa (mg L ⁻¹)	2110	1990
Teor de FAMES (mg.g ⁻¹)	620	562
Estimativa de FAMES (mg.L ⁻¹)	130	111,9

Fonte: Própria.

Os dados evidenciam que os rendimentos máximos em termos de número de células.L⁻¹ foram os mesmos, o valor da biomassa total foi ligeiramente menor após deprivação de N₂ e o teor de ácidos graxos (FAMEs, do inglês: Fatty Acids Methyl Esters) e as estimativas de FAMEs por litro de cultivo diminuíram na ausência de nitrogênio. Tais resultados contrastam com o que tem sido registrado por outros autores, em que as quantidades de substâncias graxas tendem a aumentar na falta de nitrogênio (por ex., SKOWALSKI, 2010).

Entretanto, análises bioquímicas efetuadas nas biomassas obtidas no experimento evidenciaram que a falta de nitrogênio no meio de cultivo resulta em aumento nas concentrações de lipídios (+10,71%), bem como de carboidratos (+ 7,58%) quando a espécie é submetida a um estresse por falta de N₂ na fase estacionária. As concentrações de proteínas permaneceram praticamente as mesmas nas duas condições testadas (com N₂ até a fase estacionária e com deprivação de N₂ na fase estacionária) (**Tabela 8**).

Tabela 8. Análises bioquímicas na biomassa cultivada da cepa D121WC (*Pediastrum tetras*), antes e depois de submetida ao estresse nutricional por deprivação de N₂ na fase estacionária.

Condições de cultivo	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)
Com N ₂ até a fase estacionária	24,72 ± 0,69	5,6%	10,28 ± 1,35
Com deprivação de N ₂ na fase estacionária	24,93 ± 2,79	6,2%	11,06 ± 0,76
% de variação	+0,85%	+10,71%	+7,58%

Fonte: Própria.

Nossos dados corroboram os achados de Chagas (2010) que também demonstrou em estudo realizado com a microalga *Isochrysis galbana* que a carência de nitrogênio resultava em aumentos de carboidratos (de 96% a 145% em cultivos em triplicata). Esta autora verificou diminuição do teor proteico nesta espécie de microalga, e para justificar este fato ressaltou que a síntese proteica é severamente afetada na falta de nitrogênio, visto ser este composto um dos elementos essenciais para o desenvolvimento e produção dos organismos, pelo fato de ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, a exemplo de proteínas e ácidos nucleicos.

Nossos dados também corroboram os resultados Mata (2009) e Ho *et al* (2014), que constataram aumento no teor lipídico em microalgas cultivadas em privação de nitrato, muito embora Mata (2009) tenha ressaltado que não se deve generalizar esta

tendência uma vez que seu estudo foi efetuado apenas com três espécies (*Botryococcus*, *Isochrysis* e *Dunaliella*).

É certo que cultivar microalgas sob estresse nutricional pela insuficiência de nitrogênio transforma o metabolismo das células ocasionado a promoção de produtos específicos que podem variar de acordo com a espécie (GUSCHINA; HARWOOD, 2006) visto que a resposta fisiológica não é a mesma para todas as espécies. Mas é relevante ressaltar que para muitas espécies este tipo de estresse efetivamente pode incrementar a produção de óleo, tornando a biomassa produzida mais favorável a produção de biodiesel.

5.3 Crescimento e análise bioquímica da espécie D121WC (Pediastrum tetras), submetida a estresse fótico.

Este experimento teve a duração de 27 dias, sendo que todos os balões de cultivo mostraram curvas de crescimento semelhantes até o 23º dia quando os cultivos atingiram a fase estacionária. Nesta ocasião dois ensaios foram interrompidos e a biomassa foi colhida, e dois balões foram transferidos para uma intensidade luminosa maior, de aproximadamente o dobro de que vinham sendo mantidos, permanecendo nessa condição de estresse fótico por mais quatro dias. A fase exponencial durou do 6º e ao 21º dia (16 dias).

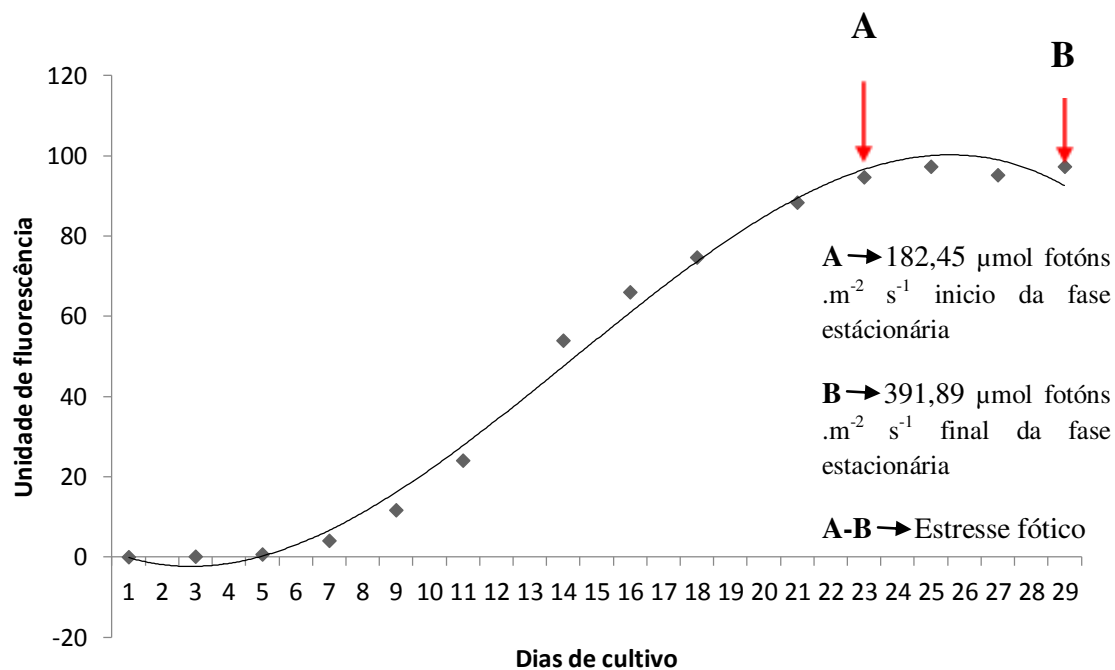


Figura 5. Respostas de crescimento da microalga D121WC (*Pediastrum tetras*) $\mu\text{mol.fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ até o 23º dia (Ponto a) e com estresse fótico positivo de aproximadamente o dobro (y $\mu\text{mol. Fótons}$), o 24º ao 27º dias.

Os dados evidenciam uma fase log do 6º ao 13º dias (16 dias de duração), sendo que o rendimento máximo celular no 23º dia chegou a $6,22 \times 10^6$ células. ml^{-1} e no 27º dia (após estresse fótico positivo de aproximadamente o dobra intensidade luminosa) o rendimento máximo chegou a $7,68 \times 10^6$ células. ml^{-1} , indicando, para esta espécie, que o aumento da intensidade luminosa ainda promove a reprodução celular. O estresse fótico submetido nesta espécie no início da fase estacionaria propiciou também um aumento no rendimento máximo da biomassa total e do teor de FAMES e, por conseguinte, na estimativa de FAMES em mg.L^{-1} (Tabela 9).

Tabela 9. Dados do cultivo sob estresse fótico obtidos para a cepa D121WC (*Pediastrum tetras*) em condições de laboratório.

Variáveis consideradas	Resultados	
<i>k</i> (média e desvio padrão)	0,22 ± 0,16	
Duração da fase log (dias)	16	
Rendimento antes e após estresse fótico	182,45 μmol fótons .m⁻² s⁻¹ (no 23º dia de cultivo)	391,89 μmol fótons .m⁻² s⁻¹ (no 27º dia de cultivo, com o dobro da intensidade luminosa)
Rendimento celular (células.mL ⁻¹ .10 ⁶)	6,22x10 ⁶	7,68x10 ⁶
Biomassa (mg L ⁻¹)	53	217
Teor de FAMES (mg.g ⁻¹)	575	650
Estimativa de FAMES (mg.L ⁻¹)	30,5	140,1

Fonte: Própria.

As microalgas possuem uma composição bioquímica bem diversificada sendo a mesma relacionada com os diferentes grupos taxonômicos, com as condições de cultivo de cada espécie e com fatores ambientais (CARDOSO, 2010), sendo considerado, segundo Chagas (2010), que ao se alterar algumas condições de cultivos ocorrerá um estímulo para a produção de alguns componentes químicos presentes na estrutura microalgal.

A luminosidade influencia na formação de compostos orgânicos pelo processo fotossintético e, portanto, na densidade e na composição bioquímica e celular (MILITÃO et al., 2013). No presente estudo, foi possível constatar que um aumento de aproximadamente 100% da intensidade luminosa (de 182,45 μmol. fótons. m² .s⁻¹ para y 391,89.μmol. fótons. m² .¹ no início da fase estacionária resultava num aumento geral nos teores de proteína, lipídeos e carboidratos, sendo que para lipídeos o aumento chegou a 160,7 %) (**Tabela 10**).

Tabela 10. Composição bioquímica de *Pediastrum tetras* em cultivo sob estresse fótico.

Condições de cultivos	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)
Até o início da fase estacionária	21,33 ± 5,22	5,6%	12,23 ± 0,71
Na fase estacionária, com o dobro da intensidade luminosa.	35,60 ± 4,70	14,6%	19,07 ± 3,86
% variação	+66,90	+160,7%	+55,92%

Fonte: Própria.

A literatura é pobre no que concerne a estudos de estresse fótico com culturas da clorofícea *Pediastrum tetras*. Mas ao que parece nem todas as espécies deste grupo de

microalgas respondem igualmente a este tipo de estresse. Militão (2013), por exemplo, constatou que aumentando a intensidade luminosa de 1200 lux para 7300 lux e para 3800 lux em cultivos da clorofíceia *Tetrastrum heteracanthum* havia redução de lipídeos totais. Por outro lado, Solovchenko (2007) em trabalho realizado com a espécie *Parietochloris incisa* verificou que em alta intensidade luminosa também ocorria aumento no teor lipídico. Estes dados indicam que as respostas fisiológicas das microalgas nas diferentes condições de cultivo não ocorrem da mesma maneira para todas as espécies.

5.4. Crescimento e análise bioquímica das microalgas D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) e D121WC (*Pediastrum tetras*) submetidas a estresse térmico.

5.4.1 *Scenedesmus acuminatus*

Esse experimento apresentou curvas de crescimento semelhantes nos dois balões mantidos a 25°C e no balão mantido a 30°C. Quanto às respostas, foram avaliadas por fluorescência in vivo, evidenciando uma fase log do 2º ao 9º dia (**Figura 6**). As medidas de contagens celulares demonstraram, no entanto que, a densidade de microalgas foi ligeiramente inferior no balão mantido a 30°C com a duração da fase exponencial terminando no 8º dia. Os rendimentos máximos chegaram a 20,48 células.L⁻¹ x10⁵ no cultivo a 25°C interrompido no 14º dia, 20,43 células.L⁻¹ x10⁵ no balão que estava a 25°C e foi transferido para 30°C, e 15,12 células.L⁻¹ x10⁵ no balão a 30°C interrompido no 14º dia (**Figura 7**).

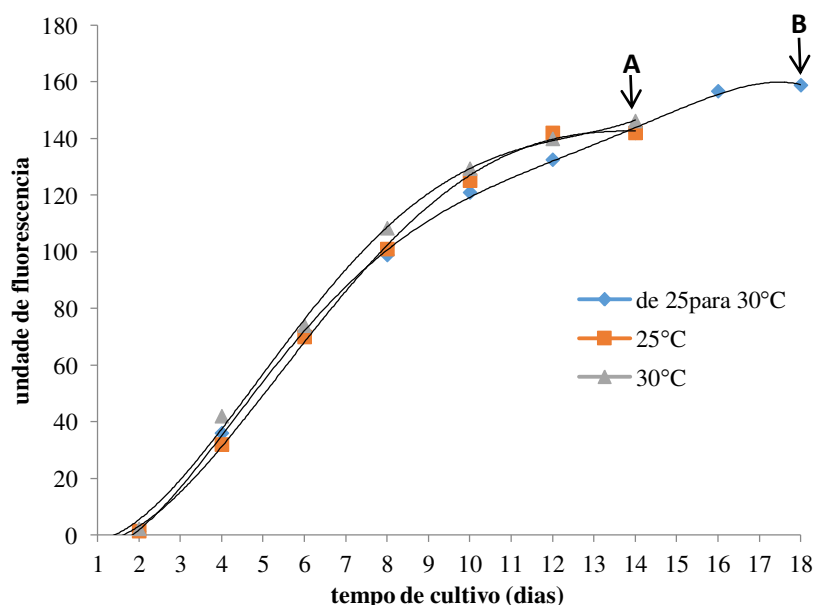


Figura 6. Crescimento da microalga D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) a 25°C e a 30°C até o 14º dia de cultivo e transferência de um dos frascos de 25°C para 30°C a partir do 14º dia (estresse positivo de 5°C).

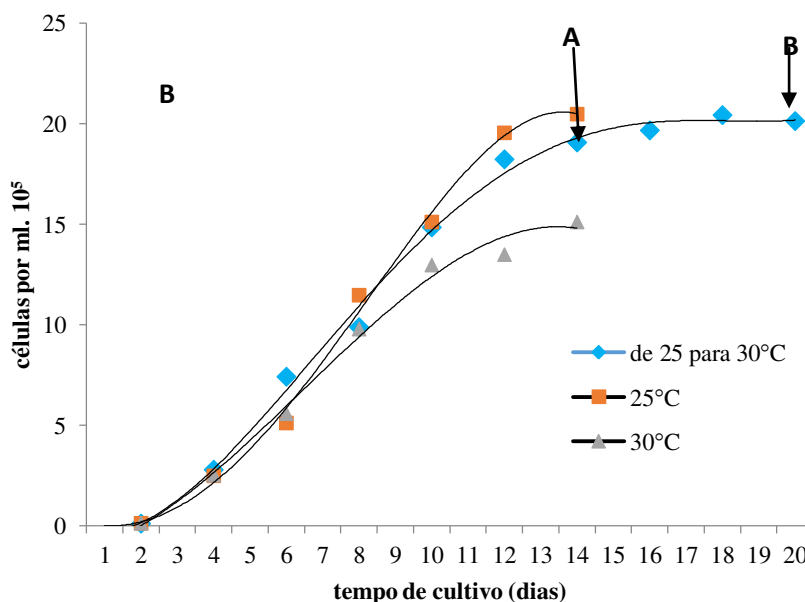


Figura 7. Crescimento da microalga D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) em células por ml.10⁵ a 25°C e a 30°C até o 14º dia de cultivo e transferência de um dos frascos de 25°C para 30°C a partir do 14º dia (estresse positivo de 5°C).

Os valores de proteínas foram maiores nos cultivos efetuados a 25°C e menores a 30°C após 14 dias de cultivo, quando as culturas entraram na fase estacionária. No entanto, quando o balão que vinha sendo cultivado a 25°C foi transferido para 30°C (estresse térmico positivo de 5°C) constatou-se uma redução substancial nos teores de proteínas em cerca de 36%. Os valores de lipídeos não foram altos nos cultivos realizados a 25°C e a 30°C, mas em situação de estresse, quando o balão a 25°C foi transferido para 30°C, esses valores aumentaram 444,38%, chegando a 35,30%. Os carboidratos por sua vez, mostraram valores mais elevados a 25°C (18,06%) e redução substancial de 38,72% quando o cultivo mantido a 25°C foi transferido para 30°C (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de proteínas, lipídeos e carboidratos obtidos para a microalga D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) nas duas condições de temperatura testadas.

Condição térmica	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)
25°C	18,35±2,43	7,94	18,08±2,14

30°C	11,78±0,75	8,73	10,35±0,57
de 25 para 30° C	13,27±2,08	35,30	11,08±2,36
% de variação	36% a menos	444,38% a mais	38,72% a menos

Fonte: Própria.

Esses dados demonstram que para esta espécie estresses térmicos podem promover mudanças nas taxas metabólicas incrementando a síntese de lipídeos o que é relevante para sua utilização na produção de biodiesel.

5.4.2 *Pediastrum tetras*

Esse experimento apresentou curvas de crescimento semelhantes nos dois balões mantidos a 25°C até o 24° dia, quando a cultura atingiu o final da fase exponencial. Neste momento o cultivo foi interrompido em dois balões e a biomassa obtida foi usada para nas análises químicas. Os outros dois balões foram transferidos para 30° C (estresse térmico positivo de 5° C), permanecendo nesta condição por mais 4 dias. A duração da fase exponencial foi de 8 dias (do 2° ao 9° dia) em todos os balões (**Figura 8**).

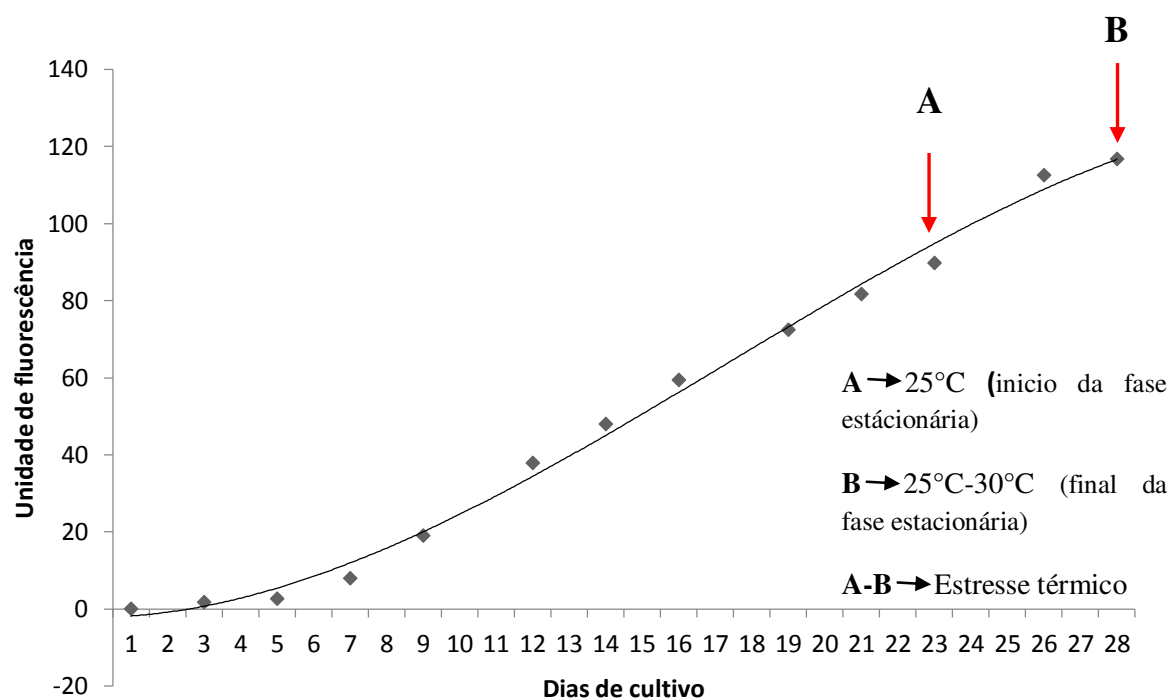


Figura 8. Crescimento da microalga D121WC (*Pediastrum tetras*) a 25°C e transferência de dois frascos de 25°C para 30°C no 24° dia (estresse positivo de 5°C).

Todos os balões apresentaram semelhanças na forma geral da curva de crescimento e semelhanças na fase log. Contagens celulares efetuadas nos momentos de interrupção dos cultivos indicaram redução de 35,59% das densidades celulares quando

os cultivos foram submetidos à um estresse térmico positivo de 5° C. A biomassa total entretanto aumentou cerca de 30%, o total de FAMES diminuiu muito levemente enquanto a estimativa de FAMES em mg.L⁻¹ aumentou (**Tabela 12**). Esses achados corroboram com os dados de Renaud et al., (2007) que também obtiveram maiores percentuais de ácidos graxos em estresse térmico de 5°C positivo (de 25° C para 30° C) nas espécies *Cryptomonas* sp., *Rhodomonas* sp. (Criptofíceas) e *Chaetoceros* sp (diatomácea).

Tabela 12. Dados de cultivo em laboratório da cepa D121WC (*Pediastrum tetras*) em diferentes condições térmicas

Condição térmica	Rendimento celular (célis.mL ⁻¹ .10 ⁶)	Biomassa (mg L ⁻¹)	FAMES (mg.g ⁻¹)	Estimativa de FAMES - (mg.L ⁻¹)
25°C	8,54	156	600	93,6
25°C a 30°C	5,50	204	562	114,7
% de variação	- 35,59%	30,76%	-6,33%	+22,54%

Fonte: Própria.

A **Tabela 13** apresenta os resultados das análises bioquímicas efetuadas nos balões cultivados a 25° C e nos balões transferidos de 25° C para 30° C (estresse positivo de 5° C) no final da fase exponencial. Os dados evidenciam uma diminuição nos teores de carboidratos e proteínas, mas um expressivo aumento nos teores de lipídios em mais de 100% nos frascos submetidos a um estresse positivo de 5° C.

Tabela 13. Valores de proteínas, lipídeos e carboidratos obtidos para a microalga D121WC (*Pediastrum tetras*) nas duas condições de temperatura testadas.

Condições térmica	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)
25°C	32,53 ± 10,69	5,6%	16, 52 ± 0,04
de 25 para 30° C	25,00 ± 7,19	11,6%	11,34 ± 0,73
% de variação	-23,14%	+107,14%	-31,35%

Fonte: Própria.

Os dados obtidos nesses ensaios chamam a atenção ao fato de que tanto a espécie *Scenedesmus acuminatus* como a espécie *Pediastrum tetras* são susceptíveis a terem seus valores de lipídeos aumentados em situações de estresses térmicos, o que é extremamente relevante para sua utilização na produção de biodiesel. Entretanto, para outros propósitos biotecnológicos há necessidades de mais estudos visto que os teores de proteínas e de carboidratos diminuíram nas duas espécies, sugerindo que outros compostos resultantes do metabolismo celular a exemplo dos corantes e antioxidantes

também possam sofrer alterações com variações da temperatura. Ao que parece, nem todas as espécies respondem positivamente quando submetidas a estresses crescentes de temperatura. Mendes (1992), por exemplo, constatou que a diminuição da temperatura influenciava no aumento do teor lipídico na espécie. *Spirulina maxima*. Roush (2003), trabalhando com a diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornotum* constatou que a temperatura não influenciava diretamente a reserva lipídica.

5.5 Avaliação do indicativo de ácido graxo por FTIR (transformada de Fourier) para a espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) nas três condições de cultivo sob estresse que foram estudadas.

Através da técnica do FTIR é possível estudar os efeitos da variação da composição química das células em função do tempo de cultivo (VANINI, 1996). Para a avaliação do indicativo de ácido graxo na espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) por esta técnica utilizou-se a relação das bandas de 2930/1550 e 1745/1550 para ácido graxo. Muitos trabalhos encontrados na literatura utilizam a análise de cromatografia ou a mancha fluorescente do Vermelho Nilo (Nile Red) para verificar a concentração de lipídeo, mas esse método possui desvantagens, como baixa eficiência e pequena sensibilidade ou simplesmente por serem análises demoradas (DEAN *et al.*, 2010).

Tabela 14. Indicativo de ácido graxo (por FTIR) da espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) para o cultivo em condição de estresse nutricional.

Relação das bandas	Em meio completo (com N₂)	Com deprivação de N₂ no final da fase exponencial
1745/1550 cm ⁻¹	2,65 ± 0,24	1,43 ± 0,60
2930/1550 cm ⁻¹	0,85 ± 0,03	0,35 ± 0,16

Fonte: Própria.

- 1745 = ligações C=O de ésteres
- 2930 = ligações C-H e CH₂ de ácidos graxos
- 1550 = ligações Amida II de proteínas: usada para normalizar as demais bandas (Neumann 2000).

Os resultados mostraram que houve uma diminuição na concentração tanto para relação que indica presença do radical carbonila quanto para relação que indica

presença de ácido graxo (**Tabela 15**). Estes resultados são similares aos de lipídeo apresentados na tabela 9, obtidos por métodos gravimétricos.

Tabela 15. Indicativo de ácido graxo (por FTIR) da espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) para o cultivo em condição de estresse luminoso.

Relação das bandas	182,45 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	391,89 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
1745/1550	1,89 \pm 0,02	0,99 \pm 0,03
2930/1550	0,57 \pm 0,01	0,46 \pm 0,34

Fonte: Própria.

- 1745 = ligações C=O de ésteres
- 2930 = ligações C-H e CH₂ de ácidos graxos
- 1550 = ligações Amida II de proteínas: usada para normalizar as demais bandas (Neumann 2000).

Nos cultivos em estresse fótico também se constatou redução nos dados de FTIR nas duas relações de bandas (1745/1550 e 2930/1550), indicando que o aumento da intensidade luminosa promove redução em ésteres em geral e nos ácidos graxos em particular. De acordo com Azeredo (2010), espécies de microalgas submetidas a condições de estresses mostram usualmente uma maior quantidade de matéria graxa. Nossos achados com a espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) parecem contrapor-se a isso, porém deve-se levar em conta que diferentes espécies de microalgas não se apresentam da mesma forma quanto ao indicativo de ácido em diferentes condições de estudo.

Já para os resultados de estresse térmico foi possível constatar um aumento para o indicativo de ácido graxo nas duas relações de bandas analisadas, e de forma muito mais expressiva na relação 2930/1500 (**Tabela 16**), indicando esses dados que ao se cultivar a microalga *Pediastrum tetras* em condição de estresse térmico ocorre efetivamente aumento na síntese de ácidos graxos.

Tabela 16. Indicativo de ácido graxo (por FTIR) da espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) para o cultivo em condição de estresse térmico.

Relação das bandas	25°C	de 25°C para 30°C no final da fase exponencial
1745/1550	1,52 \pm 0,24	1,16 \pm 0,82
2930/1550	0,26 \pm 0,02	1,04 \pm 1,00

Fonte: Própria.

- 1745 = ligações C=O de ésteres
- 2930 = ligações C-H e CH₂ de ácidos graxos
- 1550 = ligações Amida II de proteínas: usada para normalizar as demais bandas (Neumann 2000).

Ressalta-se que há carência de informações publicadas a respeito dessa espécie com esta técnica de análise, mas Converti et al., (2009) mostraram em *Chlorella vulgaris* (também clorofícea) ocorria um grande aumento do indicativo de ácidos graxos ao diminuir a temperatura de 30°C para 25°C enquanto que Rousch et. al., (2003) demonstrou que *Chlorella muelleri* (também clorofícea) os indicativos de ácidos graxos aumentavam ao aumentar a temperatura de 24°C para 30°C. Nossos dados corroboram os achados de Rousch et al. (2003), mas considerando as divergências entre esses estudos pode-se inferir que ao menos para as clorofíceas, cada espécie responde de forma diferente aos estresses térmicos às quais foram submetidas, sugerindo que tanto mudanças positivas como negativas da temperatura podem promover alterações no metabolismo celular a ponto de incrementar a produção de ácidos graxos.

A análise do potencial energético da cepa D121WC (*Pediastrum tetras*) mostra que aumentos nos teores de ésteres de ácidos graxos ocorreram de forma expressiva apenas nos cultivos em estresse fótico, cujo teor de FAMES chegou a 650mg/g com o aumento da intensidade luminosa, enquanto que em estresses térmico e nutricional houve redução nos teores de FAMES (**Figura 9**). Esses dados contrastam com os resultados de FTIR que mostraram aumento na concentração de ácidos graxos no estresse térmico de 5° C positivo. Também contrastam com os dados de FTIR obtidos no estresse fótico que mostraram redução nos teores de ácidos graxos por esta técnica, nesta condição de cultivo.

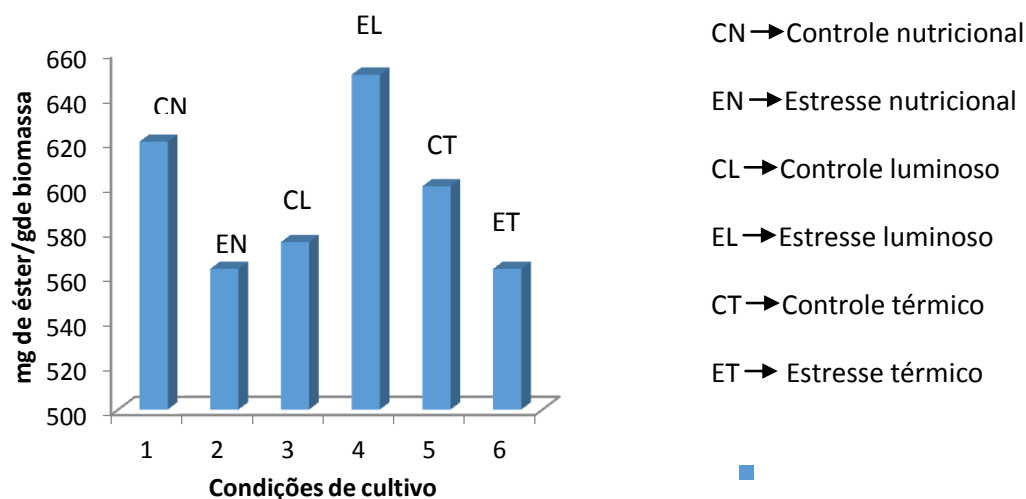


Figura 9. Teores de ácidos graxos nas três condições de cultivo em estresse (nutricional, fóico e térmico) para a espécie D121WC (*Pediastrum tetras*).

Ressalta-se, com esta análise, que a utilização do FTIR teve o intuito de detectar um indicativo da existência de éster em organismo microalgal. Contudo comparando-se a composição energética da soja que é de 196,9 mg de ésteres por grama de biomassa seca e que hoje é oleaginosa mais empregada produção de biodiesel no Brasil (MENEZES *et al.*,2013), com o teor de éster encontrado na cepa *Pediastrum tetras* que quando submetida ao estresse luminoso verifica-se uma concentração de ácidos graxos 2,5 vezes maior que a soja. Menezes *et al.* (2013), ao avaliar o potencial da matéria graxa da espécie *Choricystis* sp também constatou um rendimento de a 422,9 mg de ésteres por grama de biomassa seca, o que é 115% maior do que o encontrado na soja. Quanto a espécie D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) ao ser submetida a um estresse térmico obteve-se um rendimento relativo em ésteres de ácido graxo em relação a soja de 590%.



Capítulo VI
CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- a) A bioprospecção de ácidos graxos efetuada em 12 espécies de microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba, todas cultivadas nas mesmas condições de laboratório, mostrou diferentes respostas nos parâmetros de crescimento e nos teores de ácidos graxos entre elas.
- b) Todas as cepas cultivadas apresentaram rendimento em biomassa inferior a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, sendo que nem todas as que tiveram os maiores rendimentos apresentaram as maiores concentrações de ácidos graxos.
- c) As espécies com maiores rendimentos em ácidos graxos e que, portanto apresentam potencial para serem utilizadas na produção de biodiesel foram *Pediastrum tetras* (cepa D121WC, com 802,1% em relação a soja) e *Scenedesmus acuminatos* (cepa D115WC, com 211,1% em relação a soja), razão pela qual foram selecionadas para serem cultivadas em diferentes condições de estresse (nutricional, fótico e térmico).
- d) Ressalta-se, entretanto, que os rendimentos em biomassa nos cultivos com essas duas espécies foram baixos (máximo de $0,49 \text{ g.L}^{-1}$).
- e) Para a espécie D121WC (*Pediastrum tetras*) submetida às três condições de estresse (nutricional, luminoso e térmico) foi possível observar respostas significativas para os resultados das análises bioquímicas, destacando-se o ensaio com estresse fótico cujo aumento no teor de lipídeo chegou a +160,7%.
- f) A espécie D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) ao ser submetida a uma estresse térmico apresentou um aumento no rendimento relativo de ésteres de ácido graxo em relação a soja de 590% em termos de biomassa seca.
- g) A utilização da técnica de FTIR como indicativo do teor lipídico mostrou resultados satisfatórios para a maioria dos tratamentos de estresse utilizados.



Capítulo VII
REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU,C.P., **Microalgas e Biocombustíveis: Entre o sonho e realidade**.Disponível em:<http://www.abq.org.br/rqi/2010/728/RQI-728-pagina24-Microalgas-e-Biocombustiveis-Entre-o-sonho-e-a-realidade.pdf>, acessado dia 22/04/2014, às 21:44h.
- ARCEO, A. A. **Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação do óleo de microalgas**.Tese (doutorado em química). Escola de Química. UFRJ. Rio de Janeiro,2012
- ARMBRUST, E. V. **The life of diatoms in the world's oceans**. *Nature*, v. 459, p. 185–192, 2009
- ARMENTA, R. E.; Scott, S. D.; Burja, A. M.; Radianingtyas, H.; Barrow, C. J.; **Chromatographia** **2009**, *70*, 629.
- BARROS,C.S.G; SILVA, A; PONCHIO,A.L; ALVES, A.R.L; OSAKI, M; CENAMO.M. **Custos de Produção de Biodiesel no Brasil**. Revista de Política Agrícola. ISSN 1413-4969 .Publicação Trimestral Ano XV - Nº 3 Jul./ Ago./ Set.2006
- BECKER, W. **Microalgae in Human and Animal nutrition**, in: A. Richmond (Ed), **Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science Ltd, 2004: pp. 312-351.
- BICALHO R. 2009. **Perspectivas do investimento em energia**. Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Economia, 226 p. Relatório integrante da pesquisa “Perspectivas do Investimento no Brasil”, em parceria com o Instituto de Economia da UNICAMP, financiada pelo BNDES. Disponível em :<http://www.projetopib.org/?p=documentos>
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. **A rapid method of total lipid extraction and purification**. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, 911-917, 1959.
- BORGHETTI, A.I., **avaliação do crescimento da microalga *chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2009. 103 p. Dissertação (Mestrado Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba,2009.
- BRASIL ECODIESEL. **Mercado de Biodiesel**. 2008. Disponível em: <http://www.brasilecodiesel.com.br/brasilecodiesel/web/conteudo_pti.asp?idioma=0&tipo=1834&conta=45>. Acesso em: 20 de setembro de 2010
- BOROWITZKA, M.A. **Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters**. *Journal of Biotechnology*. n.70, p.313-321, 1999.
- CALIJURI M.C.; ALVES MSA; SANTOS A.A. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**, São Carlos, Ed. Rima, 2006, 109p

CARDOSO, A. S; VIEIRA, G. E. G; MARQUES, A. K. **Uso de microalgas para obtenção de biocombustíveis.** Revista Brasileira Biociências, Porto Alegre, v. 9, p. 542 - 549, out/dez 2011.

CARDOSO, A. S; VIEIRA, G. E. G. **Avaliação do potencial das microalgas residuais como uma alternativa à cadeia produtiva do biodiesel.** In: Fundação Roberto Marinho; Gerdau; CNPq. (Org.). Energia e Meio Ambiente: soluções para o futuro. Rio de Janeiro: Fundação Roberto Marinho, 2011, v. , p. 221-246.

CHAGAS,B.M.E.,**Influência do estresse nutricional programado na composição da microalga *isochrysis galbana*.** 2010.131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

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

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

DZUMAN,J.M. **Efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo da microalga *scenedesmus sp* para a produção de biodiesel.** 100 p. Dissertação (mestrado Engenharia Química), Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013,

DEAN, A.P.; SIGEE, D.C.; ESTRADA, B.; PITTMAN, J.K. **Using ftir spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae.** Bioresour. Technol. 2010, 101, 4499–4507.

DEL CAMPO, J.A M GARCÍA-GONZÁLE AND GUERRERO,M.G. **Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives,** Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:1163–1174

.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.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. **Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria.** Química Nova. v. 32., p. 776-792, 2009.

SEBRAE (Brasil). **Cartilha Biodiesel**. 2007?. Disponível em: < www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf>. Acessado em: 8 de agosto de 2010.

FRANCO,C.L.A., LOBO,P.I., CRUZ, S.R., **Biodiesel de microalgas: avanços e desafios**. Quim. Nova, Vol. 36, No. 3, 437-448, 2013.

FAMINTZIN . Die anorganischen salze als ausgezeichnetes hilfsmittel zum studium der entwicklung neiderer chlorophyllhaltiger organismen. *Bulletin of the Academy of Sciences, St. Petersburg*,187117 31-70.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. **Yellow-green algae with chlorophyllidc**. Journal of Phycology, v.8, p.10-14, 1972.

Gouveia, L.; Oliveira, A. C.; **Microalgae as a raw material for biofuels production. j ind microbiol biotechnol** v.36, p.269-2774, 2009

GUIRY, M. D. **How many species of algae are there?** p.1057–1063. Article first published online: 20 SEP 2012 | DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x

HARTMAN,L., LAGO, R.C. A . **Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids**. Londres : Lab. Pract., v. 22, p. 475-476, 1973.

HUNDT, K.; REDDY, B. V. **Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions**. International Journal of Low-Carbon Technologies, v. 6, p. 294-298, 2011.

KOCHERT,G.Carbohydrate **determination by the phenol- sulfuric in:** HELLEMBUST,J.A,GRAIGIE,J.S.(eds). **Handbook of Phycological Methods.Physiological and Biochemical** methods.Cambridge: Cambridge: Cambridge University 1978.p.95-97

KOWALSKI, Silmara Carvalho. **Análise da viabilidade técnica e econômica do cultivo de microalgas para a produção de biodiesel** : estudo de caso em Paranaguá – Estado do Paraná / Silmara Carvalho Kowalski. -- Curitiba, 2010.

KUCEK, K. T.. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**.. 123 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná,2004.

Leal, C.L; Leal L.V M. **O Biocombustível no Brasil**. Revista Novos Estudos, nº 78, Julho de 2007.

- Lewis, T.; Nichols, P. D.; Mcmeekin, T. A.; *J. Microbiol. methods*, **2000**, *43*, 107.
- LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B. **Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris***. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4717-4722, 2008.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.
- LOWRY, H.O.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951
- SANTANA, S.K.J. **Microalgas sob a ótica da biotecnologia e do uso popular em comunidades rurais com ênfase em espécies isoladas do bioma caatinga**. 141 P. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento e Meio Ambiente). PRODEMA. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.
- SCHROEDER, **Obtenção de ácidos graxos de biomassa úmida de microalgas através de saponificação** 90 p. Dissertação (mestrado Engenharia e Ciência dos Materiais), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- SEMIÃO, C.J.F. **Produção de *single cell oil* para biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico em simultâneo com troca simbiótica de correntes gasosas em circuito fechado**. 102 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Biológica), Lisboa, 2013
- MACEDO RT, ALEGRE RM. **Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura – Parte II: Produção de lipídios**. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2001; 21(2):183-6.
- MAKAREVICIENE, V.; ANDRULEVICIUTE, V.; SKORUPSKAITE, V.; KASPEROVICIENE, J. Cultivation of Microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* as a Potential Biofuel Feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21-27, 2011.
- 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, p. 217– 232, 2010.
- MELO, J. C. . **Otimização da Produção de Biodiesel**. Pernambuco, 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.
- MENEZES, R. S; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. **Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel**. *Química Nova*, v. 13, n. 1, p. 10-15, 2013

MIRANDA, F.P. **Efeito de diferentes meios de cultura para o crescimento de *tetrastrum heteracanthum* (nordstedt) chodat 1895 como base para a produção de biocombustíveis.** Espirito Santo, 76f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas)- Faculdade Católica Selesiana do Espirito Santo. Vitória, 2013.

MARIOKA, I.R.L.; PAGGI, M.A.; OLIVO, G. e SANT'ANNA, E.S. **Floculação de *chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares.** *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 1, 44-49, 2014.

MURPHY R.; Woods J.; Black M.; McManus M. 2011. **Global developments in the competition for land from biofuels.** *Food Policy*. 36, S52–S61.

NOGUEIRA, S.N. **Análise Delphi e SWOT das Matérias-primas de Produção de Biodiesel: Soja, Mamona e Microalgas. 177P.** Dissertação (mestrado em ciências) Programa de pós graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010

NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. **Biocombustíveis.** Brasília, 2004. (Cadernos NAE, 2).

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado.** S. l.: s. n., 1999.

OLIVEIRA, A.C. **Produção de biomassa de microalgas *scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido.** 2013. 82 p. Dissertação (mestrado em Engenharia e ciências de Materiais) PIPE, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2013.

OCDE/IEA (2010). **World Energy Outlook 2010.**]

PEQUENO, G.A.M. **Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa.** 66 p. Dissertação (mestrado em química) Departamento de química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

PEREIRA, P.M.C; HOBUSS, B.C; MACIEL, V.J; FERREIRA, R.L; DEL PINTO, B.F; MESKO, F.M. **Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas.** *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 10, 2013-2018, 2012

PENTEADO, D. M. R. **Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para a produção de Lipídios.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PICARDO, Marta Cristina. **Desempenho de *isochrysis galbana* na produção de óleo e sequestro de CO₂ com fotobiorreator piloto.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. **The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources.** *Bioresource Technology*, v. 102, p. 17–25, 2011

REYNOL, F. Notícias BR do Brasil. **Ciência e Cultura.** V.60, n.2, p.1-5, 2008.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture:** biotechnology and applied phycolgy. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

ROUSCH, M. SCOTT E.B, MILTON R.S. **Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*295 (2003) 145 – 156

SCHMIDT, C. J. B.. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.** 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), p 1 – 16, 2007.

TEDESCO, C. **Remoção de cromo vi pela microalga *spirulina platensis*** 2010. 56 p. Dissertação (Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Ambiental) – Universidade Passo Fundo, Passo Fundo, 2010

UKELES, R. 1976. **Cultivation of plants, unicellular plants.** pp. 367–466 in: O. Kinne (ed.), *Marine Ecology III*, Part 1. John Wiley and Sons, New York, New York.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.C.; JU, Y.H.. **Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 40, p. 13-20, 2009.

XU, L. et al.. **Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor.** *Eng. Life Sci.*, v. 12, n. 2, p.171 – 177, 2012.

XU, H.; MIAO, X.; e WU, Q. **High quality biodiesel production from a microalga *chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters.** *Journal of Biotechnology*, v.126, p.499-507, 2006.

ZARROUK, C., . **Contribution l'étude d'une cyanophyce e influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *spirulina maxima*** (Setch et Gardner) Geitler PhD thesis. University of Paris. Paris. France,1966.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. **Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions:** *Biochemical Engineering Journal*, 6, p. 87 - 102, 2000;

