

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**MÁRIO UBIRAJARA GONÇALVES BARROS**

**EFEITO DA SALINIDADE NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS PELA  
MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898).**

**FORTALEZA  
2010**

**MÁRIO UBIRAJARA GONÇALVES BARROS**

**EFEITO DA SALINIDADE NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS PELA  
MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann,1898).**

Monografia apresentada ao  
Departamento de Engenharia de Pesca  
do Centro de Ciências Agrárias da  
Universidade Federal do Ceará, como  
parte das exigências para a obtenção do  
título de Engenheiro de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald  
Lobo Farias.

**FORTALEZA  
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B279e Barros, Mário Ubirajara Gonçalves.  
Efeito da salinidade no teor de lipídios produzidos pela microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) / Mário Ubirajara Gonçalves Barros. – 2010.  
27 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.  
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Diatomáceas. 2. Salinidade. 3. Lipídios. I. Título.

CDD 639.2

---

**MÁRIO UBIRAJARA GONÇALVES BARROS**

**EFETTO DA SALINIDADE NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS PELA  
MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann,1898)**

Monografia submetida à Coordenação do curso de graduação em Engenharia de Pesca, da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em: 23 / 06 / 2010 :

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D.Sc.  
Orientador/Presidente**

---

**Prof .Ricardo Lafaiete Moreira, M.Sc.  
Membro**

---

**Prof<sup>a</sup>. Erivânia Gomes Teixeira, M.Sc.  
Membro**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu força e Luz nos momentos difíceis, me dando sempre a recompensa pelo meu esforço.

Aos meus pais, irmã, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A minha namorada Paloma Ribeiro pela dedicação, incentivo e amor, me apoiando sempre nas horas difíceis, Obrigado.

Ao professor Wladimir Ronald Lobo Farias pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia, muito obrigado professor.

Aos meus amigos do CTA, que sempre foram muito presentes na minha vida acadêmica, sugerindo e incentivando meus trabalhos.

Ao meu amigo Anderson Alan da Cruz Coelho, que sempre me incentivou e se mostrou disponível para me ajudar na conclusão desse trabalho, oferecendo seu conhecimento e seu tempo, muito obrigado.

A todos os professores, que contribuíram para minha formação, sempre tirando minhas dúvidas, muito obrigado.

Ao amigo Leonardo José Brandão Lima de Matos e ao professor Fabiano André, do departamento de Engenharia Química da UFC por cederem o espaço para a realização das extrações lipídicas e seus conhecimentos de suma importância para esse trabalho.

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC pelo incentivo, apoio e amizade.

A todas as pessoas que contribuíram de maneira direta e indireta para a elaboração desta monografia.

## RESUMO

Nos últimos anos, muito interesse tem se voltado para o potencial dos cultivos de microalgas, devido principalmente às suas aplicações na alimentação de organismos aquáticos cultivados e do homem, bem como na extração de substâncias de importância farmacêutica, produtos industrializáveis e também como matéria prima para a extração de lipídios para a produção de biocombustíveis. O presente trabalho teve como objetivo cultivar a microalga marinha *Chaetoceros muelleri*, nas salinidades 15, 25 e 35 e avaliar a influência da concentração de sal do meio na produção de lipídios pela microalga. As culturas foram realizadas em meio Guillard f/2, na temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e submetidas à iluminação e aeração constantes, em torno de  $200 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $4 \text{ L ar min}^{-1}$ , respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata em recipientes de 9 L, com um volume útil de 7 L. Após o cultivo, as microalgas foram floculadas através da adição de NaOH 2N, lavadas e desidratadas em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas, obtendo assim a biomassa seca. Para a extração do óleo, foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959), assistido em um banho ultrasônico na frequência de 40 kHz e potência de 80 W. Os teores de lipídeos, obtidos em cada salinidade, foram submetidos a uma análise de variância (fator único) com 0,05% de significância estatística. As culturas nas salinidades de 15 e 25 apresentaram um desenvolvimento semelhante e, superior do observado na salinidade de 35. Com relação à produção de lipídios, não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo obtido para as salinidades de 15, 25 e 35 teores de  $10,41 \pm 1,89$  ;  $10,87 \pm 2,10$  e  $12,33 \pm 1,81\%$ , respectivamente. Com isso podemos concluir que a variação de salinidade, não incrementou a produção lipídica, no entanto, o cultivo nas salinidades 15 e 25 devem ser preferidos, por alcançarem, uma maior densidade celular o que resultará quantitativamente numa maior produção total de lipídios

**PALAVRAS CHAVE:** Diatomáceas. Salinidade. Lipídios

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		PÁG
FIGURA 1	Imagem microscópica microalga diatomácea <i>Chaetoceros muelleri</i> .	13
FIGURA 2	Frasco de 3.000 mL com o inóculo inicial de <i>Chaetoceros muelleri</i> utilizado para a realização do experimento e o frasco de 9.000 mL de cultivo.	19
FIGURA 3	Fluxograma da extração de lipídios totais através do método de Bligh e Dyer (1959).	22
FIGURA 4	Correlações lineares entre $DO_{700nm}$ e contagem de células ( $cel.ml^{-1}$ ) das culturas de <i>C. muelleri</i> nas salinidades 15 (a), 25 (b) e 35 (c).	23
FIGURA 5	Curva de crescimento de <i>C. muelleri</i> em Diferentes salinidades (15, 25 e 35‰) de cultivo.	24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1. Microalgas e meio de cultivo	18
3.2. Condições de cultivo	19
3.3. Delineamento experimental e acompanhamento dos cultivos	19
3.4. Obtenção da biomassa de <i>C.muelleri</i>	21
3.5. Extração de lipídios	21
3.6. Análise Estatística	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
4.1. Correlação linear	23
4.2. Curvas de Crescimento	24
4.3. Concentração celular e Taxa de crescimento	25
4.4. Rendimento lipídico	27
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>30</b>



## EFEITO DA SALINIDADE NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS PELA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898).

MÁRIO UBIRAJARA GONÇALVES BARROS

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de combustíveis biológicos constitui uma das melhores alternativas para reduzir as emissões de CO<sub>2</sub>. Além de menos poluentes que os combustíveis fósseis, como o petróleo, os combustíveis biológicos não injetam mais carbono nos ecossistemas, pois empregam apenas frações que já estavam presentes na biosfera (LOURENÇO, 2006).

As microalgas vêm sendo consideradas como fonte potencialmente útil para a produção de biodiesel, pois sua produtividade supera a de qualquer vegetal comercialmente produzido no mundo. Além disso, diversas espécies apresentam elevadas concentrações de lipídeos, encerrando altas concentrações de energia, características necessárias para a produção de combustíveis. As microalgas marinhas, sobretudo as diatomáceas, são mais promissoras ainda devido ao elevado teor de lipídios em suas células. (BROWN et al., 1997).

Comparadas a outras opções biológicas para a captura e a utilização de CO<sub>2</sub>, as culturas de microalgas têm como principais vantagens: alta produtividade, habilidade para capturar nutrientes das águas residuais, aproveitamento das fontes de água salgadas (não apropriadas para outros usos) e a sua elevada eficiência no uso da água.

As microalgas são uma atrativa alternativa às oleaginosas como soja, milho e palma. Isso por causa da sua elevada produção de lipídios, que faz com que elas possam produzir bem mais óleo por hectare, podendo potencialmente reduzir o custo de produção dos biocombustíveis. Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em instalações industriais com o uso de fotobioreatores, evitando qualquer conflito com a produção de alimentos (PEREZ, 2007).

As microalgas da espécie *Chaetoceros muelleri* (Figura 1) são eucarióticas, pertencem à classe Bacillariophyta (diatomáceas), ordem centrales e família Chaetoceraceae (HOEK et al.,1995). Estas microalgas apresentam, como pigmentos principais, as clorofilas a, c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>, xantofilas (fucoxantina) e carotenos, os quais conferem às mesmas uma coloração geralmente marrom-amarelada. Possuem uma parede celular formada por duas partes que se encaixam, composta principalmente por sílica e utilizam a crisolaminarina e lipídios como substâncias de reserva energética. Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a concentração de lipídios totais da microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada em três diferentes salinidades.



**Figura 1** –Microalga *Chaetoceros muelleri* .(Fonte: Algae from Bemeryde, 2006. Disponível em: <http://www.lifesciences.napier.ac.uk/algalweb/bemeryde06.htm>. Acesso em 12, Maio. 2010.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Microalgas são organismos unicelulares, filamentosos e coloniais, com pouca ou nenhuma diferenciação celular que constituem a base das cadeias tróficas aquáticas, onde podem ser encontradas em suspensão ou aderidas aos substratos (OSHE et al., 2008). São caracterizadas pela presença de pigmentos, responsáveis por coloração variada e pelo metabolismo, geralmente, fotoautotrófico. Segundo Hoek et al. (1995) e Raven et al. (2001), as microalgas são divididas em espécies procarióticas representadas pelas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; ou eucarióticas com representantes nas divisões Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta, Bacillariophyta, Chrysophyta, Xantophyta, Cryptophyta e Dinophyta.

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas, não só aquáticos, mas também no ambiente terrestre o que implica em uma grande variedade de espécies, vivendo em uma ampla gama de condições ambientais. Estima-se que existam mais de 50.000 diferentes espécies de microalgas, mas apenas cerca de 30.000 já foram estudadas e analisadas (RICHMOUD, 2004)

As microalgas podem ser autotróficas ou heterotróficas, as primeiras exigem apenas compostos inorgânicos, como CO<sub>2</sub>, sais e a luz como fonte de energia para o crescimento, enquanto as últimas, não-fotossintéticas, requerem uma fonte externa de compostos orgânicos, bem como outros nutrientes como fonte de energia. Algumas microalgas fotossintéticas são mixotróficas, ou seja, eles têm a capacidade de realizar fotossíntese, bem como adquirir energia a partir de nutrientes orgânicos (LEE, 1980).

Segundo Olaizola (2003), as microalgas são consideradas uma fonte potencialmente rica de vários produtos químicos, os quais podem ser aplicados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, bem como no tratamento de águas residuais (SOARES et al., 2006), porém a maior importância, atualmente, do cultivo de microalgas deve-se ao fato, delas serem utilizadas para nutrição de organismos aquáticos cultivados em escala comercial, principalmente nos primeiros estágios do ciclo de vida de peixes e crustáceos marinhos, pois fornecem um conteúdo de ácidos graxos essenciais, sobretudo os poliinsaturados, importantes para o crescimento e metamorfose das larvas (BECKER, 2004)

As microalgas também são utilizadas na alimentação humana, sendo comercializadas como suplemento alimentar natural, já que possuem vários pigmentos carotenóides como a

astaxantina, o betacaroteno, a luteína entre outros, que são conhecidos por suas propriedades terapêuticas. Elas são encontradas na forma de pó, tabletes, cápsulas ou extratos (GILL e VALIVETY, 1997)

A manutenção da vida no planeta depende das várias espécies de microalgas, pois se estima que elas produzam mais oxigênio do que o somatório de todas as plantas superiores (PEREZ, 2007). Além disso, neste processo consomem o equivalente em gás carbônico. O acúmulo de CO<sub>2</sub> na atmosfera produz um grave efeito sobre o meio ambiente global, contribuindo com o efeito estufa. O controle total da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera é muito importante para o equilíbrio da biosfera, portanto as microalgas marinhas são uma boa ferramenta para a solução deste problema, devido à alta capacidade de fotossíntese e velocidade de crescimento, principalmente no ambiente marinho que representa 70% da superfície da terra e possui uma grande quantidade de CO<sub>2</sub> solúvel. (TAKAGI et al., 2005)

Outros estudos em biotecnologia que utilizam as microalgas para a obtenção de energia vêm ganhando atenção especial, pois se afirma que esses microrganismos possuem óleos com características físico-químicas similares aos óleos vegetais e a óleos de peixes (LOURENÇO, 2006) e por isso podem ser consideradas como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel.

Alguns estudos mostram que as microalgas possuem um elevado rendimento de óleo, pelo menos 11 vezes superior ao encontrado no dendê (CÂMARA, 2006), que é oleaginosa terrestre de maior produtividade conhecida (Tabela 1), tornando-se uma ótima alternativa para a produção de biodiesel, pois seria possível produzir até 50 ton. ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de óleo (PEREZ 2007) e, dependendo da espécie cultivada e das condições de cultivo, essa produtividade poderia ser

**Tabela 1.** Produtividade de plantas superiores.

<b>Culturas</b>	<b>Produtividade (ton ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>)</b>
Amendoim	1,2
Dendê	4,4
Girassol	0,9
Mamona	0,24
Soja	0,6
Microalga	50

(Fonte: Adaptado de Gil Câmara em Agronegócios de plantas Oleaginosas, 2006)

As microalgas possuem uma série de características e vantagens que as tornam uma atrativa fonte de substituição aos combustíveis fósseis: devido ao potencial para alcançar uma alta produtividade usando a fotossíntese para converter energia solar em energia química, o curto ciclo de vida (SHEEHAN et al., 1998), alta taxa de crescimento, alto rendimento de óleo e a habilidade para absorver nutrientes de águas residuais como  $\text{NH}_4^{4+}$ ,  $\text{NO}_3^{-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ . Além disso, podem ser produzidas em fontes de águas salgadas, podem ser cultivadas em áreas impróprias para fins agrícolas, não competindo com a produção de alimentos e, não necessitam do uso de água doce.

A manipulação das condições físico-químicas dos cultivos pode resultar em diferenças na composição celular, ou seja, variações nos teores de lipídios, proteínas, carboidratos e outros componentes constituintes da célula. Esta característica, aliada a simplicidade das técnicas de cultivo, torna as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação (BENEMANN et al., 1987). Lipídios totais de microalgas são compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas de ácidos graxos saturados (AGS) ou insaturados (AGI), contendo de 12 a 22 carbonos e podem exercer diversas funções biológicas podendo atuar como componente de membranas celulares, isolantes térmicos, reserva de energia e como agentes reguladores da flutuação de algumas espécies na coluna d'água (LOURENÇO, 2006).

Os principais fatores físico-químicos que afetam o crescimento das microalgas são a luz, temperatura, salinidade e a disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975; RICHMOND, 2004) que, aliados as boas praticas de assepsia e manejo, garantem o sucesso do cultivo.

O conteúdo médio de lipídios presente nas células das microalgas geralmente varia entre 15 e 70%, mas pode atingir até 90% da biomassa seca sob condições específicas. Desta forma, fatores como intensidade luminosa, temperatura, salinidade e composição química do meio de cultura, podem modificar o perfil químico das espécies cultivadas (BROWN et al., 1997).

Estudos têm relatado que as microalgas produzem mais óleo em condições desfavoráveis em comparação com a condição ótima de crescimento (HU et al., 2008). Sob condições ideais de crescimento, as microalgas sintetizam ácidos graxos, principalmente para a esterificação em lipídios de membrana, que constituem cerca de 20-50% do seu peso seco. Mas, sob condições ambientais desfavoráveis ou de estresse, muitas microalgas alteraram o

seu conteúdo lipídico pelas vias biossintéticas para a formação e acúmulo de lipídios neutros como os triacilgliceróis (TAG) (HU et al.,2008).

Os lipídios encontrados nas microalgas são compostos, essencialmente, por uma mistura de ácidos graxos insaturados, como palmitoléico (16:1), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3). Os ácidos graxos saturados como o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) também estão presentes porem em pequena quantidade. (HU et al.,2008).

As diatomáceas são espécies de microalgas com distribuição cosmopolita, ocorrem no mar, em água salobra, em água doce e são importantes indicadores ecológicos porque são sensíveis as variações de fatores como salinidade, temperatura, pH e poluição. Estas microalgas também possuem altas concentrações de gotículas de óleo e crisolaminarina dentro de suas células (BROWN et al., 1997). As diatomáceas são caracterizadas por apresentarem uma parede celular inorgânica chamada de frústula com várias formas. A frústula é composta de sílica polimerizada ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) e está dividida em duas metades (valvas) que se encaixam. A valva maior da frústula é denominada epiteca e a valva menor de hipoteca (RAVEN, 1988).

Segundo Perez (2007), as diatomáceas, juntamente com algumas cianobactérias, são microalgas que possuem elevado teor de lipídios em sua estrutura celular, principalmente durante o período de *stress* ambiental, como em condição de deficiência de nutrientes e variação de salinidade.

De acordo com Alyabyev et al. (2007), o estresse salino provoca uma série de alterações bioenergéticas e bioquímicas no organismo fotossintético e as mais importantes são o aumento das taxas de biopolímeros e catabolismo de lipídios, alterações nas taxas de energia gerando processos bioquímicos e alteração da permeabilidade da membrana com a interrupção da homeostase iônica. Estas alterações estão relacionadas com aspectos bioenergéticos e são essenciais para a compreensão dos mecanismos adaptativos das microalgas à salinidade. Sabe-se que aumenta a demanda de energia das células sob condições adversas (DE WIT, et al., 1997; NEUMANN, 1989). O gasto adicional de energia metabólica sob condições de estresse é necessário para manter o equilíbrio iônico e os gradientes eletroquímicos, para permitir a biossíntese de compostos orgânicos que desempenham um papel importante na proteção, osmorregulação e manutenção da estrutura celular. Neste contexto, o aumento da taxa de liberação de energia pode assegurar a adaptação das microalgas, rápido e eficaz ao stress (TAYLOR, 1983).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microalgas e meio de cultivo

Foi utilizada a microalga *Chaetoceros muelleri*, obtida no cepário do Laboratório de Centro de Tecnologia em Aquicultura (CTA) do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da Universidade Federal do Ceará, onde as mesmas são mantidas em tubos de ensaio com temperatura e luminosidade controladas. O meio de cultivo usado para a manutenção dos inóculos e para a realização dos experimentos foi o meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975), cuja formulação e composição são apresentadas na tabela 2.

**TABELA 2.** Composição do meio de cultivo Guillard f/2.

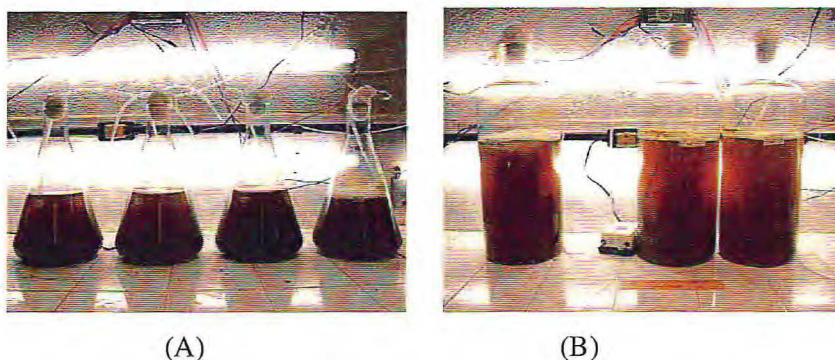
Soluções	Reagentes	Solução-estoque (mg 1000 mL <sup>-1</sup> )	Meio de cultura
1	Nitrato de Sódio	75,0	1 mL
2	Fosfato de Sódio	5,0	
3	Silicato de Sódio	12,0	1 mL
	Sulfato Cúprico	9,8	1 mL
	Sulfato de Zinco	22,0	
4	Cloreto de Magnésio	10,0	
	Molibdato de Sódio	6,3	
	Cloreto de Ferro	3,0	1 mL
	Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	4,6	
5	Vitaminas	-	0,5 mL

### 3.2 Condições de cultivo

Os cultivos foram submetidos a uma aeração constante ( $4 \text{ L ar min}^{-1}$ ), através do uso de bombas de diafragma. A temperatura da sala de cultivo e a intensidade luminosa foram mantidas em  $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $200 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. A iluminância dos cultivos foi ajustada, regulando a distancia da luz para os garrafões de cultivo, sendo avaliada com ajuda de um luxímetro digital. A iluminação constante foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W com o objetivo de obter uma maior taxa fotossintética e consequentemente, maior produtividade. Todo o material utilizado no experimento, incluindo os tubos de ensaio, erlenmeyers e garrafões com capacidade para 9 L foram previamente lavados com água e detergente, enxaguados e, posteriormente esterilizados em autoclave a uma temperatura de  $120^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

### 3.3 Delineamento experimental

Os cultivos foram realizados nas salinidades 15, 25 e 35, em triplicatas e atemporais, utilizando frascos de nove litros (Figura 2B) com volumes úteis de sete litros, sendo 4,5 L de meio Guillard e 2,5 L de uma pré-cultura de *C. muelleri* (Figura 2A) produzida no mesmo meio (inóculo). Após a inoculação da microalga, não houve mais a adição de meio de cultura no frasco durante todo desenvolvimento do cultivo (Figura 2B), caracterizando uma cultura do tipo estacionária ou “batch” (LOURENÇO, 2006).



**Figura 2** – Frascos de 3.000 mL com o inóculo inicial de *chaetoceros muelleri* (A) e frascos de 9.000 mL contendo o cultivo de *Chaetoceros muelleri* na fase final de crescimento (B)



Após a diluição dos inóculos, os cultivos das microalgas, nas três salinidades e triplicatas, foram iniciados com uma  $DO_{700nm}$  de 0,100 sendo também mantidas constantes as mesmas condições luz, nutrientes, temperatura, aeração e pH.

O acompanhamento dos cultivos foi realizado através da obtenção da densidade óptica e contagem de células. A densidade óptica ( $DO_{700nm}$ ) foi determinada através de um espectrofotômetro de leitura direta no comprimento de onda de 700 nm. A determinação da densidade óptica inicial dos cultivos foi realizada, segundo Sipaúba Tavares e Rocha (2001), utilizando a relação  $V_F = D_F/D_I \times V_I$ , em que  $V_F$  = Volume final a ser mantido;  $D_F$  = densidade óptica desejada,  $D_I$  = densidade do inóculo e  $V_I$  = volume do inóculo.

A contagem celular foi realizada em um microscópio óptico, utilizando uma câmara de Neubauer espelhada. Para a contagem, foi retirada uma alíquota de 5mL e fixada com formol neutralizada com tetraborato de sódio (bórax), sendo expressa em  $cel\ mL^{-1}$ .

Os valores médios de contagens de células, obtidos das três repetições de cada salinidade, foram utilizados para traçar as curvas de crescimento, nas quais foram identificadas as fases de crescimento ao longo do cultivo, bem como utilizados para determinar as concentrações celulares máximas ( $X_{max}$ ) e as taxas de crescimento em divisões por dia ( $K$ ), que foram obtidas nos dias de maiores produtividades das culturas (OHSE et al., 2008). A taxa de crescimento  $K$  foi calculada de acordo com Lourenço (2006), através da equação:

$$K = \frac{\log_2(N_f - N_0)}{D_t}$$

onde:  $K$  é a taxa de crescimento;  $N_0$  e  $N_f$  as densidades ópticas no início e no dia em que o cultivo obteve a máxima concentração celular, respectivamente, e  $D_t$  a duração do cultivo em dias.

Estas duas variáveis foram submetidas a uma correlação linear e, posteriormente, foi obtida a equação de regressão linear entre as mesmas, através da fórmula  $Y = a \cdot X + b$ , onde  $Y$  corresponde à densidade celular ( $cel\ mL^{-1}$ );  $X$  à densidade óptica ( $DO_{700nm}$ );  $b$  o coeficiente angular ou inclinação da reta  $a$  o coeficiente linear (XU et al., 2006).

### 3.4 Obtenção da biomassa de *C.muelleri*

Ao chegar ao final da fase de crescimento exponencial, identificada através de espectrometria e contagem celular, as culturas foram floculadas com a adição de NaOH 2N.

Após a sedimentação dos flocos, o meio de cultivo foi separado da biomassa algal, através de sifonamento e a mesma foi lavada com água destilada para retirada do excesso de sal. Posteriormente, a biomassa da microalga *C. muelleri* foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por 24h.

### 3.5 Extração de lipídios

A extração de lipídios da biomassa seca, foi realizada no departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, seguindo a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). Para isso, 5 g da biomassa seca de *C.muelleri* foram adicionados em um erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. O erlenmeyer foi fechado e imerso por durante 40 minutos, em banho ultrasônico com frequência de 40 kHz e potência de 80 W. Em seguida, foram adicionados mais 12,5 mL de clorofórmio e 12,5 mL de água destilada à mistura que foi novamente levada ao banho, por mais 20 minutos. A parte sólida foi filtrada a vácuo e, posteriormente, seca em estufa durante 24 h na temperatura de 105°C para a recuperação da biomassa. A metodologia da extração lipídica pode ser observada na figura 3.

Após a formação de duas fases distintas no líquido filtrado, uma formada por clorofórmio que, por ser hidrofóbico e apolar, contém lipídios e outra por metanol e água, hidrofílica e polar, a primeira, contendo os lipídios, foi separada e, após a evaporação do clorofórmio, o teor de lipídios foi quantificado por pesagem. A concentração de lipídeos totais na biomassa foi determinada por diferença de massa do sólido, antes e depois do processo de extração, sendo feita três extrações da biomassa de cada salinidade utilizada. O percentual lipídico (PL) total foi calculado pela equação:

$$PL(\%) = \frac{(\text{peso antes da extração} - \text{peso após a extração})}{5g} \times 100$$

5g

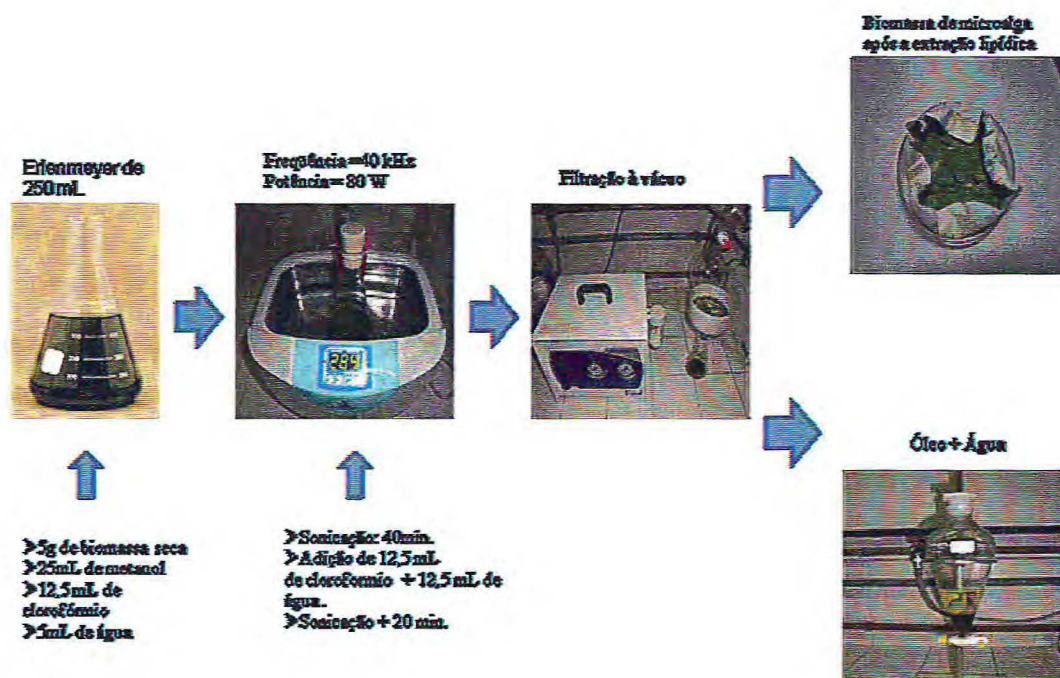


Figura 3 – Fluxograma da extração de lipídios totais através do método de Bligh e Dyer (1959).

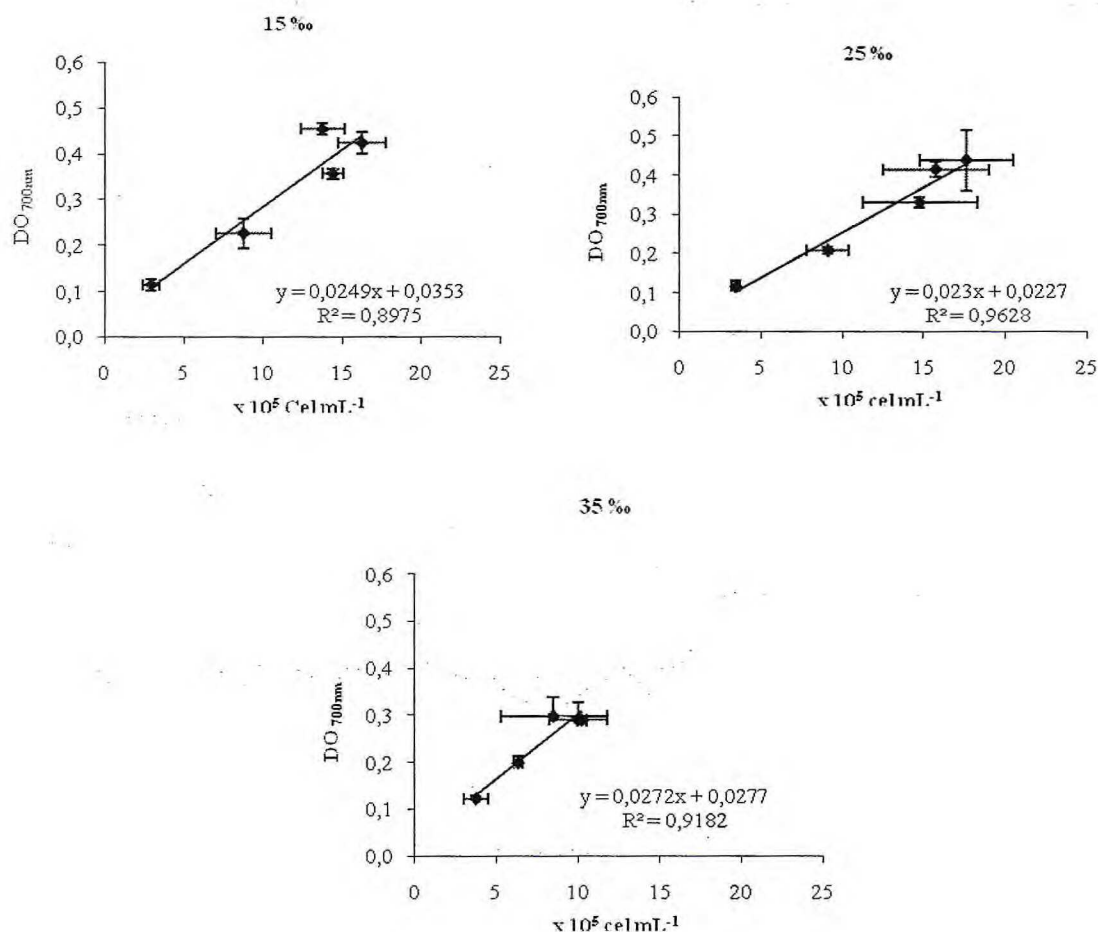
### 3.6 Análise Estatística

Para comprovar se houve diferença estatística entre as concentrações de lipídios nas diferentes salinidades experimentadas, na taxa de crescimento e produtividade máxima dos cultivos, os dados foram submetidos a análises de variância unifatorial (ANOVA) e, posteriormente, no caso de existir diferença significativa, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises o nível de significância foi de 5%.

## 4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Correlação linear

As determinações diárias de  $DO_{700nm}$  e contagem de células ( $cel\ ml^{-1}$ ) das culturas nas três salinidades utilizadas apresentaram fortes correlações lineares com coeficientes de determinação próximo de um, o que permitiu a determinação das equações de regressão linear para conversão de um parâmetro em outro (Figura4).



**Figura 4** – Correlações lineares entre  $DO_{700nm}$  e contagem de células ( $cel.ml^{-1}$ ) das culturas de *C. muelleri* e respectivas equações de regressão linear, nas salinidades 15, 25 e 35.

Cada ponto nas curvas se refere à média de três repetições  $\pm$  desvio padrão. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e as retas de regressão também estão indicadas em cada diagrama.

Segundo Oliveira (1993), a curva de crescimento só pode ser ajustada pelo modelo de regressão linear até o início da fase estacionária, pois a partir de então, além de não ocorrer incremento líquido da população o número de células também diminui, reduzindo a correlação.

## 4.2. Curvas de Crescimento

Os perfis das curvas de crescimento (Figura 5), obtidos das culturas realizadas nas salinidades 15 e 25 foram bastante semelhantes, com fases de crescimento exponenciais bastante acentuadas, se diferenciando apenas no último dia de cultivo, quando a densidade celular nos cultivos realizados na salinidade 25 foi significativamente superior. Já nos cultivos realizados na salinidade 35, a curva de crescimento evidenciou um menor desenvolvimento da população algal durante todo cultivo. Oshe et al. (2007) cultivaram a mesma espécie em salinidade 30 e obtiveram uma curva de crescimento mais demorada, levando em torno de sete dias para entrar na fase estacionária.

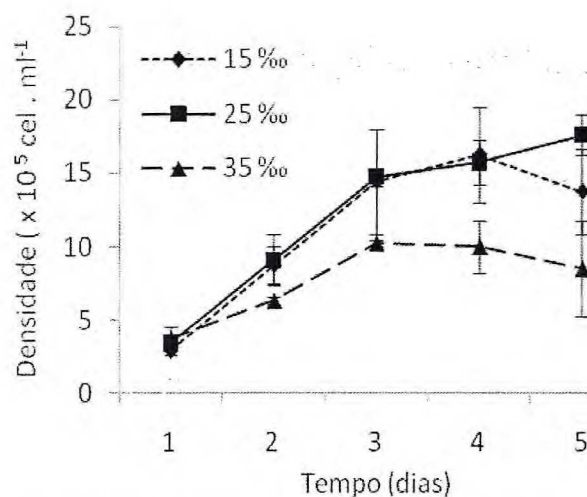


Figura 5 – Curvas de crescimento de *C. muelleri* cultivada nas salinidades 15, 25 e 35

A fase de crescimento exponencial, ou fase log, foi observada do primeiro ao terceiro dia nos cultivos realizados nas três salinidades, a partir deste momento os cultivos nas salinidades 15 e 25 entraram na fase de diminuição do crescimento relativo, a qual se prolongou até o quinto dia de cultivo apenas na salinidade 25. Não foi observada a fase de indução do crescimento para os três tratamentos. O cultivo realizado na salinidade 35 alcançou a fase estacionária já a partir do terceiro dia de cultivo, tendendo à senescência a partir do quarto dia. Por outro lado, após a redução do crescimento relativo no quarto dia, o cultivo realizado na menor salinidade já apresentou uma tendência de morte.

As microalgas cultivadas nas três salinidades foram floculadas para obtenção da biomassa seca no quinto dia de cultivo, quando já se observa uma tendência de estagnação no crescimento populacional, resultante da diminuição da disponibilidade de nutrientes no meio, entre outros fatores. Para um ótimo desempenho do cultivo de microalgas, vários nutrientes são essenciais ao desenvolvimento algal, como nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e enxofre, bem como micronutrientes como ferro, boro, cobre, zinco, vanádio, molibdênio e sódio, geralmente presentes nos meios de cultivo (SIPAÚBA: ROCHA, 2003).

#### 4.3. Concentração celular e Taxa de crescimento

Foi observada uma variação significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de concentração celular máxima (CCM) entre as salinidades estudadas. Os cultivos nas salinidades de 15 e 25 alcançaram maiores valores de CCM, não apresentando diferença significativa entre ambos. A maior taxa de crescimento foi observada na salinidade 15, atingindo essa máxima concentração em torno de 73 horas (Tabela 3).

Oshe et al., (2007), ao cultivarem a mesma espécie em salinidade 30, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e radiação de  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , obtiveram CCM de  $38,65 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$ . Renaud et al. (2002) avaliaram o crescimento de 18 espécies de microalgas na salinidade  $25 \pm 1$ , temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e radiação de  $80 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os autores observaram uma densidade de  $28,9 \times 10^5 \text{ cel. mL}^{-1}$  para a espécie *Chaetoceros* sp, valores superiores aos encontrados neste experimento.

O cultivo da diatomácea *C. muelleri*, em meio guillard f/2, a uma temperatura de  $19^\circ\text{C}$ , e intensidade de luz de 1500 lux, com injeção de  $\text{CO}_2$ , resultou em CCM de 30 a  $120 \times 10^5$

cel.mL<sup>-1</sup>. Já em um cultivo utilizando fotobiorreator, Krichnavaruck et al. (2005) encontraram para *C. calcitrans* a densidade celular máxima de  $88 \times 10^5$  cel. mL<sup>-1</sup> na fase estacionária, mostrando a eficiência destas estruturas.

Análise da variância revelou significância ( $P < 0,05$ ) para taxa de crescimento nas três salinidades (Tabela 3). O maior valor de crescimento foi observado na salinidade 15 ‰, atingindo essa máxima concentração em torno de 73 horas, após a inoculação, na salinidade de 35‰, onde se obteve a concentração mais rápida em torno de 48 horas após o início do cultivo e na salinidade de 25‰, na qual observamos uma curva mais acentuada de crescimento obtivemos valores em torno de  $0,55 \pm 0,1$  divisões dia<sup>-1</sup>, porém seu tempo de concentração máxima foi mais tardio em torno de 96 horas, o que se manteve constante durante o cultivo, o que explica o fato desta salinidade ter um melhor desenvolvimento para a microalga estudada.

Renaud et al. (2002) cultivaram *Chaetoceros sp* com temperaturas semelhantes ao deste trabalho, nas salinidades 15 e 25 e obtiveram 0,87 e 0,56 divisões dia<sup>-1</sup>, valores bem semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Os cultivos das diatomáceas *Chaetoceros wighami* e *Amphora coffeaeformis* em meio de cultura guillard f/2, salinidade de 30, temperatura de 28°C e radiação de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  resultaram em taxas de crescimento de 0,95 e 0,72 divisões dia<sup>-1</sup>, respectivamente. valores próximos aos encontrados neste experimento (RAJADURAI et al., 2005). Já para a diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, Reinfelder et al. (2000) obtiveram taxas de crescimento variando de 1 a 1,5 divisões dia<sup>-1</sup>. Amplitude esta, significativamente próxima, a taxa de crescimento obtido na salinidade de 15‰.

**Tabela 3.** Parâmetros de rendimento cinético das culturas de *c.muelleri* em três diferentes salinidades.

Salinidade (‰)	Tempo de máxima concentração (horas)	Taxa de crescimento (divisões dia <sup>-1</sup> )	Concentração celular máxima (x 10 <sup>5</sup> cel mL <sup>-1</sup> )	Rendimento Lipídico (%)
15	73 ± 1 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,12 <sup>a</sup>	16,3 ± 1,50 <sup>a</sup>	10,41 ± 1,89 <sup>a</sup>
25	96 ± 1 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,11 <sup>b</sup>	17,6 ± 2,90 <sup>a</sup>	10,87 ± 2,10 <sup>a</sup>
35	48 ± 1 <sup>c</sup>	0,63 ± 0,18 <sup>ab</sup>	10,3 ± 0,30 <sup>b</sup>	12,33 ± 1,81 <sup>a</sup>

#### 4.4 Rendimento lipídico

Segundo Pernet et al (2003) o teor de lipídios das microalgas parece ser altamente variável e está relacionado às condições ambientais. A influência da intensidade de luz, temperatura, nutrientes e o estágio de desenvolvimento da cultura no teor de lipídeos e ácidos graxos de microalgas tem sido bastante estudada. A produção e armazenamento de lipídios por microalgas em resposta a variações nos fatores ambientais são específicos para cada espécie de microalga, tornando difícil a generalização. No entanto, com base na literatura, parece que o conteúdo lipídico das diatomáceas aumenta drasticamente quando as culturas atingirem a fase estacionária devido a um fator limitante do crescimento, como a redução dos níveis de silicato ou nitrogênio. Os valores de rendimento lipídico nas três salinidades não apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) em relação ao peso seco das microalgas, sendo obtidos, para as salinidades de 15, 25 e 35, teores de  $10,41 \pm 1,89$ ;  $10,87 \pm 2,10$  e  $12,33 \pm 1,81\%$ , respectivamente

Renaud et al (2002) avaliaram a influência da temperatura no crescimento, na composição química e de ácidos graxos de *Chaetoceros* sp em temperaturas em torno de 25 °C e encontraram cerca de 16,8% de lipídios para ( $P < 0,05$ ), esta espécie, valor próximo aos obtidos neste estudo. Já foi demonstrado que altas temperaturas favorecerem a formação de ácidos graxos saturados em muitas espécies de microalgas marinhas (THOMPSON 1999). A fluidez das camadas de fosfolipídios na membrana celular depende do grau de insaturação de ácidos graxos, sendo mais fluída com o aumento da insaturação (HARWOOD: SARGENT 1988). Sánchez-Saavedra e Voltolina (1998) observaram o efeito da qualidade da luz no cultivo de *Chaetoceros* sp, utilizando diferentes fontes de luz. Quando o cultivo foi realizado com uma fonte de luz branca, o rendimento de lipídios foi maior

Takagi, et al (2005) produziram a microalga *Dunaliella tertiolecta* e verificaram que a concentração celular diminuiu com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultivo, mas foi verificado um aumento no teor de lipídios intracelular, e alto percentual de triglicerídeos, na fase de crescimento exponencial, porém o aumento na concentração de NaCl não foi uma boa estratégia, devido a acentuada diminuição na concentração celular

No presente trabalho, o rendimento lipídico não foi influenciado pelas salinidades testadas, no entanto, a concentração celular máxima sofreu esta influência e foi significativamente maior nas salinidades de 25 e 15 (Tabela 3). Assim, quantitativamente poderão ser conseguidas maiores produções totais de lipídeos, principalmente em larga escala,



levando em consideração o total de células produzidas nestas salinidades. Além disso, a possibilidade de se cultivar comercialmente microalgas em larga escala, utilizando água com salinidade em torno de 25 no Estado do Ceará é bem maior, tendo em vista a proximidade do mar.

Converti et al (2009) afirmaram que o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* e seu teor de lipídios podem ser afetados pela temperatura de cultivo. Os autores obtiveram em uma temperatura de 30° C, uma redução de 17% na taxa de crescimento quando comparados a uma temperatura de 25°C e uma redução significativa na quantidade de lipídios de  $14,71 \pm 0,30$  para  $5,90 \pm 0,42$  g 100g de alga seca<sup>-1</sup>. Já a microalga *Nannochloropsis oculata*, o conteúdo de lipídios duplicou, passando de  $7,90 \pm 0,21$  para  $14,92 \pm 0,82$  g 100g de alga seca<sup>-1</sup>. Quando a concentração de nitrogênio no meio foi reduzida em 75%, houve um aumento da quantidade de lipídios de 7,90 para 15,31% em *Nannochloropsis oculata* e de 5,90 para 16,41% em *C. vulgaris*, mostrando assim que cada espécie de microalga possui parâmetros ideais para o crescimento e produtividade lipídica.

As diferentes classes de microalgas diferem muito em seu conteúdo de carboidratos, assim como no de proteínas e lipídios. Embora as diferenças na composição bioquímica de muitas espécies possam ser o resultado de diferenças genéticas, as mesmas podem, algumas vezes, ser atribuídas às condições de cultivo ou ao estágio de desenvolvimento da microalga (BROWN et al.,1997).

Futuros estudos, mais detalhados, são bastante promissores como a caracterização dos lipídios encontrados na microalga *Chaetoceros muelleri* podendo assim indicar e qualificar os diferentes tipos de lipídios. O uso de fotobioreatores, também é uma alternativa, para uma maior e mais rápida produtividade, bem como diferentes técnicas de separação da microalga do meio de cultivo e o aproveitamento da biomassa resultante da extração de lipídios para a obtenção de outros compostos com atividade biológica. Além disso, a variação de outros parâmetros como temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa, composição do meio de cultura e tipo de cultura pode ser utilizada para um possível incremento lipídico.

## REFERÊNCIAS

ALYABYEV, A.JU. , N.L. LOSEVA, L.KH. GORDON, I.N. ANDREYEVA, G.G. RACHIMOVA V.I. TRIBUNSKIH,, A.A. PONOMAREVA, R.B. **Kemp The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells**, p.66-70, march 2007

BECKER, E W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 293p. 1994.

BECKER, E.W. **Microalgae in human and animal nutrition**. In:RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture:biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science. p.312-320. 2004

BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 47-53, Feb. 1987.

BENEMANN, J. R. CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management** , v. 38, p. 475-479, 1997.

BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, n. 1-4, p. 315-331, May, 1997.

CÂMARA, G.M.S., HEIFFIG, L.S. **Agronegócios de plantas Oleaginosas: Matérias primas para biodiesel**. Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura."Luiz de Queiroz", Dep. De produção vegetal, Piracicaba, São Paulo, 2006

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E, Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, Jun, 2009.

DE WIT. P.J, R. LAUGE, G. HONEE, M.H. JOOSTEN, P. VOSSEN, M. KOOMAN,GERSMANN, R. VOGELSANG, J.J.M. VERVOORT AND A. VAN LEEUWENHOEK, **J. Microbiol. Serol.** **71** p. 137-141.,1997.

GILL, I.; VALIVETY, R. **Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications.** *Trends in Biotechnology*, n.15, p.401-409, 1997.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrate animal.** SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds.). New York: Plenum Publishing, p. 29-60, 1975.

HARWOOD, 1988. J.L. HARWOOD , **Fatty acid metabolism.** *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **39** .pp. 101–138.1988

HOEK, C.; MANN.; D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology.** Cambridge: Cambridge University, p.623-630, 1995.

HU. Q, M. SOMMERFELD, E. JARVIS, M. GHIRARDI, M. POSEWITZ AND M. SEIBERT *ET AL.*, **Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances,** p. 621–639.2008

KRICHNAVARUK, S.; LOATAWEESUP, W.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT,P. **Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airliftphotobioreactor.** *Chemical Engineering Journal*, v. 105, n. 3, p. 91-98, Jan 2005.

LEE, R. E. **Phycology.** 2<sup>o</sup> ed. Cambridge University Pres Cambridge, p.645, 1980

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações.** São Carlos: Rima, v. 1, p588-620. 2006.

NEUMANN.D, L. NOVER, B. PARTHIR, R. RIEGER, K.D. SCHARF, R. WOLLGIEHN AND U. NEIDEN, **Biol. Zentralbl.** **108** p. 15.1989

OSHE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 7-18, Jun. 2008.

OLAIZOLA, M. **Commercial development of microalgal biothecnology: from the test tube to the marketplace.** *Biomolecular Engineering*, pag. 359-466. 2003

OLIVEIRA, A. **Crescimento das diatomáceas bacillariophyceae *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em**

**condições controladas de temperatura e salinidade.** 1993. 204 f., Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

PEREZ, H.E.B. Biodiesel de microalgas – Parte 1. **Instituto de pesquisas energéticas e nucleares.** São Paulo p. 1-19. 2007.

PERNET .F , R.TREMBLAY , M. ROUSSY, E. DEMERS, Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis sp.* grown in a semicontinuous system, **Aquaculture** **221** p.393–406 ,2003.

RAJADURAI, M.; POORNIMA, E. H.; NARASIMHAN, S. V.; RAO, V. N. R.; VENUGOPALAN,. Phytoplankton growth under temperature stress: Laboratory studies using two diatoms from a tropical coastal power station site. **Journal of Thermal Biology**, **30**: p.299-305, 2005

RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University, p. 331-356, 1988.

RAVEN, P.H. **Biologia vegetal.** 6. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.906. 2001

REINFELDER, J. R.; KRAEPIEL, A. M. L.; MOREL, F. M. M.. Ucellular C4 photosynthesis in a marine diatom. **Nature**, **407**:p. 996-999.2000

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. **Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures.** *Aquaculture*, v. 211, p. 195-214, 2002.

RICHMOND. **Handbook of microalgal culture: bio-technology and applied phycology.** Blackwell Science, Oxford, UK, p. 566-572. 2004.

SARGENT ET AL., J.R. SARGENT, R.J. HENDERSON AND D.R. TOCHER , **The lipids.** In: H. Halver, Editor, *Fish Nutrition* vol. **2**, Academic Press, London (1989), p. 153–218.1989

SÁNCHEZ-SAAVEDRA & VOLTOLINA **The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros sp.* grown with different light sources ,1998.**

SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, ROESSLER P. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: **biodiesel from algae**. P.580, National Renewable Energy Laboratory, USA,1998.

SOARES, R; PEIXOTO, S; WASIELESKY, W; D'INCAO, F. **Effect of different food items on effect of different food items on the survival and growth of *Farfantepenaeus paulensis* post larvae**. Aquaculture Research, v. 37, n. 14, p. 1413–1418, Oct 2006.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H & ROCHA . **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: Rima, 106p, 2003

TAYLOR G.J., **Plant Physiol. Biochem.** 27 p. 605–611.1983.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, n. 3, p. 223– 226, Mar. 2005.

THOMPSON,P.A , **The response of growth and biochemical composition to variations in daylength, temperature and irradiance in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae)**. pp. 1215–1223,1999

XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 499-507, Dec. 2006.