



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

**ACUMULAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS DURANTE A FASE ESTACIONÁRIA
DE CULTIVO DA MICROALGA *Tetraselmis tetraathele***

ANDERSON ALAN DA CRUZ COELHO

**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.**

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
DEZEMBRO/2009**

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)

C614a Coêlho, Anderson Alan da Cruz.

Acumulação de lipídios totais durante a fase estacionária de cultivo da microalga
Tetraselmis tetraele / Anderson Alan da Cruz Coêlho. – 2009.
29 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2009.
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Lipídeos. 2. Microalgas. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, Ph.D.
Orientador/Presidente

Prof Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.
Membro

Prof^a. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc.
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu orientador, pela transmissão de conhecimentos e práticas nesta área de estudo e pelas valiosas sugestões destinadas aos experimentos realizados no laboratório e, sobretudo, para esta monografia.

Aos colegas do Grupo de Estudo e Pesquisa em Microalgas (GPEM) e do Centro de Tecnologia em Aquicultura (CTA) pelas críticas, sugestões e, acima de tudo, pela amizade.

Vocês me chamam de Mestre e de Senhor e têm razão, pois sou mesmo. Se eu, o Senhor e o Mestre, lavei os pés de vocês, então vocês devem lavar os pés uns dos outros. Pois eu dei o exemplo para que vocês façam o que eu fiz.

Jesus Cristo, em João 13, 13-15.

SUMÁRIO

RESUMO	II
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. Microalga e meio de cultivo	5
2.2. Correção entre densidade óptica e biomassa	5
2.3. Sistema de cultivo	6
2.4. Obtenção da biomassa de <i>T. tetrahele</i>	7
2.5. Extração de lipídios	8
2.6. Determinação de nitrato	9
2.7. Parâmetros de rendimento cinético e lipídico	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
3.1. Determinação da biomassa microalgal	11
3.2. Efeito da depleção de nitrato na produtividade algal	11
3.3. Parâmetros de crescimento microalgal	13
3.4. Rendimento e produção lipídica	15
4. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	18

RESUMO

O estágio de crescimento em culturas de microalgas e a manipulação das condições físico-químicas dos cultivos podem resultar em diferenças na composição celular. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da depleção de nutrientes no crescimento e produtividade algal, bem como no rendimento e produtividade lipídica, durante o cultivo da microalga *Tetraselmis tetraathele* concentração de NaCl igual a 0,5 M, temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com iluminação e aeração constantes, em torno de $200 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 4 L ar min^{-1} , respectivamente. As microalgas foram cultivadas em recipientes de nove litros, com volume útil de oito litros, em duplicata e atemporal. Os resultados mostraram que a taxa média de crescimento no início da fase estacionária foi de $0,62 \pm 0,003$ divisões dia^{-1} , consideravelmente maior que no final desta fase, ocorrendo também em uma maior produtividade algal ($2,28 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$). Da mesma forma, o melhor rendimento lipídico ocorreu até o início da fase estacionária, obtendo valor de $31 \pm 1,3 \text{ g } 100 \text{ g de alga seca}^{-1}$, uma vez que o acúmulo lipídico após este instante foi de apenas 25 % em um mesmo período de tempo, ou seja, só ocorreu um aumento de $08 \pm 2,4 \text{ g } 100 \text{ g de alga seca}^{-1}$ em quatro dias. Ficou evidente que não há necessidade de cultivar esta microalga até o fim da fase estacionária para se obter uma boa produtividade de biomassa e um rendimento lipídico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS	PÁG.
FIGURA 1 Imagem microscópica (objetiva de 40x) microalga verde <i>Tetraselmis tetrathele</i>	04
FIGURA 2 Frasco de 3.000 L com o inóculo inicial de <i>Tetraselmis tetrathele</i> utilizado para a realização do experimento e o frasco de 9.000 L de cultivo	06
FIGURA 3 Floculação das células microalgais após a adição do Hidróxido de sódio (NaOH 2N)	07
FIGURA 4 Fluxograma dos passos realizados para a extração lipídica	08
FIGURA 5 Curva de calibração entre DO_{680nm} e biomassa ($g L^{-1}$), reta de regressão linear e coeficiente de determinação (R^2)	11
FIGURA 6 Curva de crescimento em biomassa ($g L^{-1}$) e curva da depleção de nitrato no cultivo da microalga <i>T. tetrathele</i>	12

LISTA DE TABELAS

TABELAS	PÁG.
TABELA I – Composição do meio de cultivo Guillard f/2	05
TABELA II – Parâmetros de rendimento cinético das culturas de <i>T. tetrahele</i> em dois momentos da curva de crescimento	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGI	Acido Graxo Insaturado
AGPIs	Acidos Graxos Polinsaturados
AGS	Acido Graxo Saturado
DO	Densidade Óptica

ACUMULAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS DURANTE A FASE ESTACIONÁRIA DE CULTIVO DA MICROALGA *Tetraselmis tetraathele*

ANDERSON ALAN DA CRUZ COELHO

1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm sido classificadas por vários critérios, tais como: tipo de pigmento, natureza dos produtos de reserva e também pelos constituintes da parede celular, além de aspectos citológicos e morfológicos, como ocorrência de células flageladas, estrutura dos flagelos, processo de formação do núcleo, a presença e a caracterização do envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (TOMASELLI, 2004). De acordo com Raven et al., (2001), as microalgas se dividem em dois grupos de estrutura celular diferente, as microalgas procarióticas e as eucarióticas.

As microalgas são encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, e por conta da alta diversidade são responsáveis, juntamente com as macroalgas, por cerca de 60% da produção primária ocorrente no planeta. Em ambientes aquáticos, as microalgas são os alimentos principais dos animais fitófagos como algumas espécies de peixes, moluscos e crustáceos, e acima disto, todos os organismos vivos dependem direta ou indiretamente do oxigênio provindo da fotossíntese realizada pelas microalgas (SHELEF; SOEDER, 1980).

Quanto ao crescimento microalgal, a reação das microalgas às condições ambientais define os fatores limitantes e estressantes. Tanto no meio natural como em culturas, o crescimento é o resultado de uma interação entre fatores biológicos, físicos, e químicos (RAVEN, 1988).

Por conta da alta produtividade as microalgas podem ser utilizadas para vários fins. Segundo Kirschbaum (2003) alguns gases, principalmente o dióxido de carbono (CO₂) o metano (CH₄) e o óxido nitroso (N₂O) retêm uma parte do

calor produzido pelos raios solares na atmosfera, impedindo que uma parcela da radiação absorvida escape para o espaço. Isto se denomina "efeito estufa", e é benéfico para a vida, pois, sem esses gases, não haveria vida no planeta e a superfície da Terra estaria coberta de gelo. Porém, já há algum tempo, os níveis atmosféricos do dióxido de carbono e de outros gases aumentaram muito, causando uma intensificação do "efeito estufa", e trazendo sérios danos ambientais ao planeta.

O controle da emissão de gás carbônico ou um programa de mitigação seria de grande importância para o ambiente. Segundo Benemann (1997), as microalgas vem se tornando cada vez mais uma das alternativas na tentativa de diminuir o efeito estufa, uma vez que estes organismos, requerem para crescer apenas água, luz, CO₂ e nutrientes inorgânicos. A alta taxa de crescimento, juntamente com estes requerimentos simples, permitem que algumas espécies sejam consideradas como fonte atrativa de biomassa, possuindo vantagem técnica e comercial (CHRONAKIS et al., 2000).

O estágio de crescimento em culturas de microalgas e a manipulação das condições físico-químicas dos cultivos podem resultar em diferenças na composição celular, ou seja, variações nos teores de lipídios, proteínas, carboidratos e outros componentes constituintes da célula. Esta característica, aliada à simplicidade nas técnicas de cultivo, torna as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação (BENEMANN et al., 1987).

Atualmente, várias espécies de microalgas vêm sendo testadas e avaliadas quanto ao uso na aquicultura, sendo muito difundido o uso de pelo menos 20 delas, por conta de suas características favoráveis, dentre as quais destacam-se o tamanho celular, ausência de toxinas, altas taxas de crescimento, facilidade de cultivo e alto valor nutricional (BROWN et al., 1997).

As microalgas produzem várias macromoléculas, dentre elas os lipídios, compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos saturados (AGS) ou insaturados (AGI), e podem exercer diversas funções biológicas como componentes da membrana, funcionando como isolantes térmicos, reserva de energia e como agentes reguladores da flutuação de algumas espécies na coluna d'água (LOURENÇO, 2006).

Guschina; Harwood (2006) mostraram que dependendo da espécie de microalga, podem ser obtidos diferentes tipos de lipídios. Entretanto, as microalgas mais utilizadas na aquicultura possuem altas concentrações de lipídios formados principalmente por ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs). Segundo Brown et al. (1997), as clorofíceas são consideradas deficientes em AGPIs em comparação a outras microalgas. Entretanto, a espécie *Tetraselmis tetrathele* é muito utilizada como alimento vivo em larviculturas de camarões (MATHUMOTO et al., 1988).

Vários artigos vêm comprovando que as microalgas são uma fonte potencial de biodiesel no futuro (MALLICK, 2002; SURESH; RAVISHANKAR, 2004; KALIN et al., 2005; MUNOZ: GUIEYSSE, 2006), porém esta idéia de uso da microalga como fonte de biocombustíveis não é nova, no entanto, só nos dias atuais que isto em se tornando mais real devido ao aumento no preço do petróleo e uma maior preocupação com o efeito estufa, o qual é muito associado ao uso dos combustíveis fósseis (GAVRILESCU; CHIST, 2005).

Outra opção para a utilização dos lipídios das microalgas é a produção de combustíveis biológicos, os quais, além de serem menos poluentes que o petróleo, não liberam mais carbono nos ecossistemas, pois empregam apenas frações presentes na biosfera (LOURENÇO, 2006). As microalgas podem ser consideradas como as principais fontes de biodiesel no futuro, uma vez que sua produtividade supera a de qualquer vegetal comercialmente produzido no mundo e o seu conteúdo de óleo pode exceder 80% do peso seco (SPOLAORE et al., 2006).

A microalga *T. tetrathele* (figura 1) é unicelular, flagelada e pertence à classe Prasinophyceae, ordem Chlorodendrales, família Chlorodendracea (TOMASELLI, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a acumulação de lipídios totais em um cultivo estacionário de *Tetraselmis tetrathele* durante a fase estacionária de crescimento, determinando assim, qual o melhor estágio da sua curva de crescimento para a extração desses compostos.



FIGURA 1 – Imagem microscópica (objetiva de 40x) da microalga verde *Tetraselmis tetrahele*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microalga e meio de cultivo

Foi utilizada a microalga *Tetraselmis tetraathele* (Figura 1), obtida no cepário do Laboratório de Centro de Tecnologia em Aquicultura (CTA) do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da Universidade Federal do Ceará. O meio de cultivo usado para a manutenção do inóculo e dos experimentos foi o meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975) e sua composição pode ser vista na tabela 1.

TABELA 1. Composição do meio de cultivo Guillard f/2.

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

¹Faz-se a solução em 50 mL de água destilada com duas ampolas da vitamina.

2.2. Correlação entre densidade óptica e biomassa

Uma amostra de um cultivo pré-estabelecido de *T. tetraathele* foi diluída várias vezes, sendo obtidas amostras com densidade óptica (DO_{680nm}) entre 0,08 e 0,8 no comprimento de onda de 680 nm, utilizando um

espectrofotômetro. Para a determinação da biomassa (g L^{-1}), cada amostra foi centrifugada ($3.000 \times \text{g}$; 5 min), lavada duas vezes com água deionizada e novamente centrifugada. Posteriormente, as amostras foram filtradas, secas em estufa a 105°C por 16 h e pesadas em balança analítica (TAKAGI et al., 2006). Finalmente, foi estabelecida, a correlação linear entre a $\text{DO}_{680\text{nm}}$ e biomassa (g.L^{-1}) para a determinação da equação de regressão linear (XU et al., 2006).

2.3. Sistema de cultivo

O cultivo foi realizado em duplicata e atemporal, utilizando frascos de nove litros, com volumes úteis de oito litros, sendo cinco litros de meio Guillard e três litros de uma pré-cultura de *T. tetrahele* (Figura 2), resultando em uma $\text{DO}_{680\text{nm}}$ inicial de 0,100. Após a inoculação da microalga, não houve mais a adição de meio de cultura fresco durante todo desenvolvimento do cultivo caracterizando, dessa forma, uma cultura do tipo estacionária ou “batch” (LOURENÇO, 2006). O meio de cultura e os frascos foram previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 122°C para evitar qualquer contaminação do cultivo.

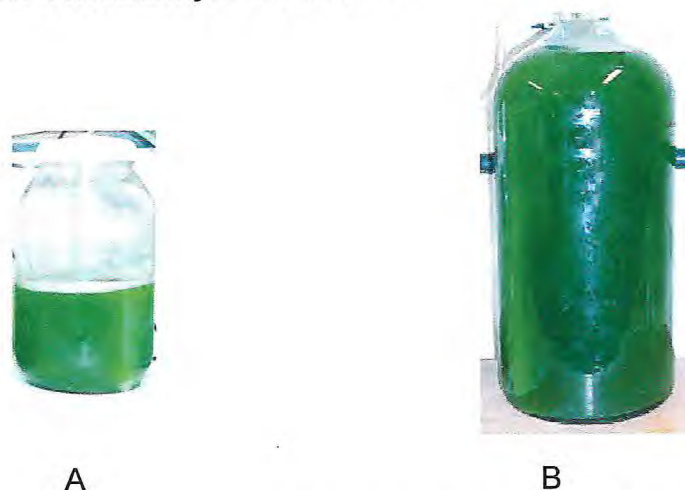


Figura 2 – Frasco de 3.000 L com o inóculo inicial de *Tetraselmis tetrahele* (A) e frasco de 9.000 L contendo o cultivo de *Tetraselmis tetrahele* na fase final de crescimento (B).

Os cultivos foram submetidos à aeração constante através de bombas de diafragma com fluxo de ar de 3 L min^{-1} , e concentração de NaCl de 0,5 M. 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, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40 W, sendo o experimento realizado sem fotoperíodo, para que se possa obter maior produtividade, tanto de biomassa como lipídica, em um intervalo de tempo menor.

2.4. Obtenção da biomassa de *T. tetrathele*

Inicialmente, amostras de 2.000 mL de cultivo, do início e final da fase estacionária do crescimento, foram retiradas por sifonamento e transferidas para frascos de 3.000 L (Figura 3), onde foram adicionados NaOH 2N para realizar a floculação das microalgas. Após a completa floculação, o sobrenadante foi descartado e os flocos foram lavados com água destilada para retirada do sal. Posteriormente, a biomassa da microalga foi seca em estufa com renovação de ar a 60°C por 24h.



Figura 3 – Floculação das microalgas após a adição de NaOH 2N.

2.5. Extração de lipídios

A extração de lipídios da biomassa, obtida no início e final da fase estacionária de crescimento, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bligh; Dyer (1959), onde os passos podem ser observados na figura 4.

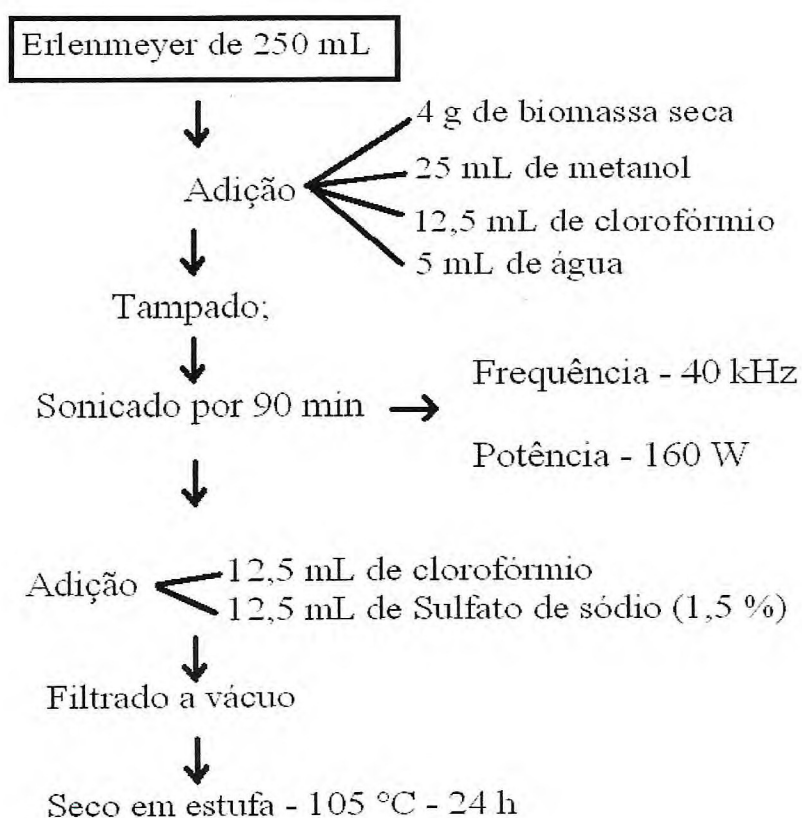


FIGURA 4 – Fluxograma dos passos realizados para a extração lipídica.

A concentração de lipídeos totais na biomassa foi determinada por balanço de massa do sólido. Para isso, as amostras foram pesadas em duplicata.

2.6. Determinação de nitrato

A depleção de nutrientes em culturas de microalgas pode ser monitorada através da determinação de nitrato (TONON et al., 2002).

A determinação de nitrato foi realizada a cada dois dias em amostras de 50 mL, centrifugadas a 3.000 x g por 5 min. Inicialmente, 25 mL da amostra centrifugada foram usados como branco para zerar a leitura no espectrofotômetro (comprimento de onda igual a 500 nm). Posteriormente, foi adicionado o reagente nitraVer 5 Nitrate nos outros 25 mL da amostra, também foi levada ao espectrofotômetro para leitura da concentração de nitrato, expressa em mg L⁻¹.

2.7. Parâmetros de rendimento cinético e lipídico

Foi calculada a taxa de crescimento em divisões por dia (K), obtidas no dia de maior produtividade das culturas (OHSE et al., 2008), calculada de acordo com a equação 1, descrita por Lourenço (2006):

$$K = \log_2 (N_f / N_0) / D_t, \quad (1)$$

Onde,

K – taxa de crescimento em duplicação por dia (divisões dia⁻¹),

N₀ e N_f – biomassas (g L⁻¹) no início e no dia em que o cultivo obteve a máxima concentração celular, respectivamente,

D_t - tempo de cultivo em dias.

A produtividade e o rendimento de lipídios foram calculados de acordo com as equações 2 e 3, descritas por Converti (2009):

$$v = C_L / t \quad (2)$$

Onde,

v – produtividade em $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$,

C_L – concentração de lipídios nas diferentes fases do cultivo analisadas,

t – duração do cultivo.

$$Y = (W_L / W_{DA}) \% \quad (3)$$

Onde,

Y – rendimento em $\text{g 100g de alga seca}^{-1}$,

W_L - peso de lipídio extraído,

W_{DA} - peso da biomassa microalgal seca no fim das culturas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da biomassa microalgal

Foi observada uma forte correlação linear positiva entre as variáveis, cujo coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,99 (Figura 5).

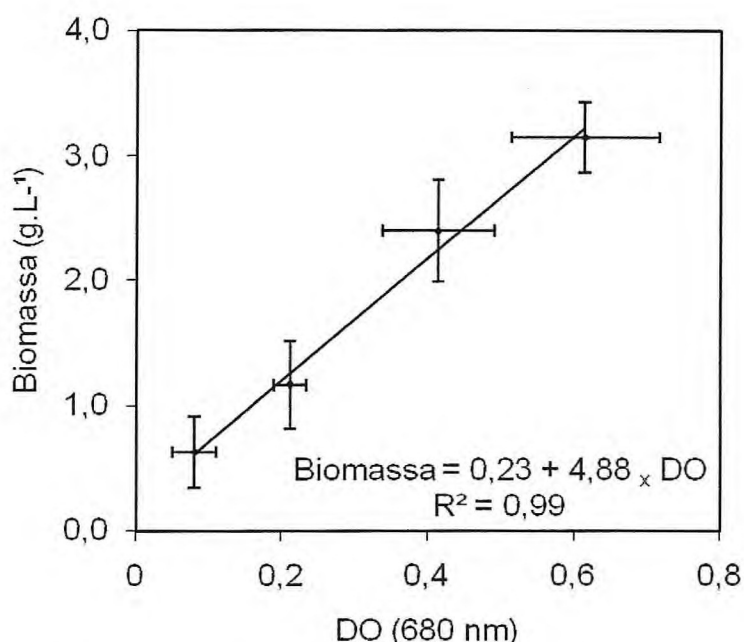


FIGURA 5 – Correlação linear entre DO_{680nm} e biomassa ($g L^{-1}$), reta de regressão linear e coeficiente de determinação (R^2). Cada ponto representa a média de três repetições.

3.2. Efeito da depleção de nitrato na produtividade algal

A curva de crescimento e a curva da concentração de nitrato tiveram comportamento antagônico, isto é, na medida em que ocorreu aumento na produção microalgal ocorreu diminuição na concentração de nitrato, ficando claro as diferentes fases do cultivo estacionário (“batch”) e o efeito da depleção de nutrientes na produtividade algal (Figura 6).

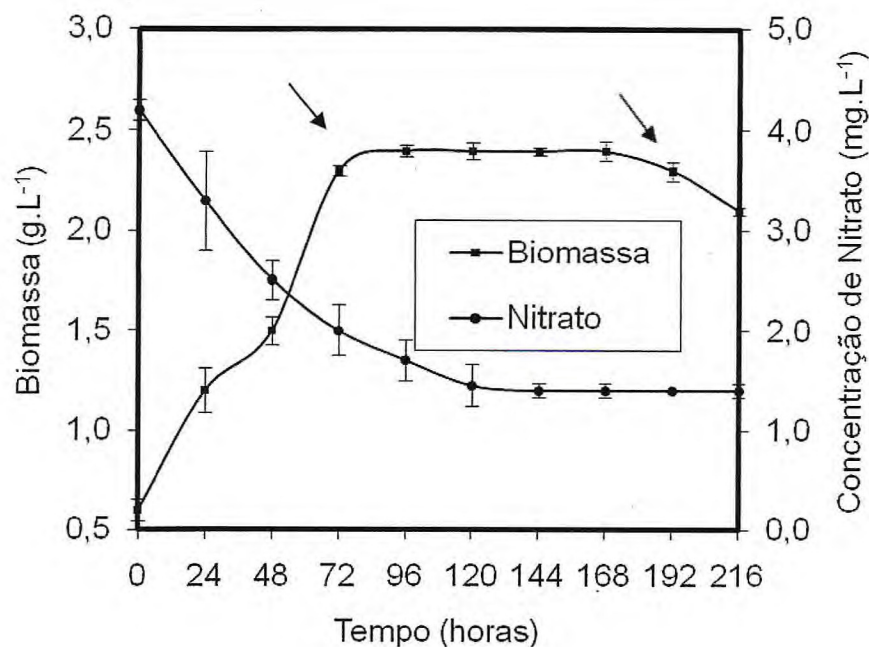


FIGURA 6 – Curva de crescimento (quadrados) em biomassa (g L^{-1}) e curva da depleção de nitrato (círculos) no cultivo da microalga *T. tetraathele*. As setas correspondem aos dias em que foram realizadas as análises de lipídios totais. Cada ponto representa a média de duas repetições \pm desvio padrão.

O nitrato (NO_3^-) é a forma mais estável de nitrogênio presente na água do mar e, possivelmente, a mais assimilada pelo fitoplâncton. Praticamente não houve diferença na concentração de nitrato, no início e final da fase estacionária de crescimento, sendo de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ no primeiro caso e de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ no último, respectivamente. Assim ficou evidenciado que a concentração de nitrato já se encontrava limitada no primeiro ponto analisado, ocorrendo, como consequência, a estabilização do crescimento microalgal, o que caracterizou este momento como sendo o início da fase estacionária do cultivo. Da mesma maneira, a biomassa algal também foi semelhante no início e final da fase estacionária (Tabela 2).

Para um ótimo desempenho do cultivo, vários nutrientes são essenciais ao desenvolvimento algal. Uns são denominados macronutrientes ou nutrientes essenciais, geralmente encontrados em quantidades significativas (nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e enxofre) e os micronutrientes

ou requeridos em pequenas quantidades pelo organismo (ferro, boro, cobre, zinco, vanádio, molibdênio e sódio) (SIPAÚBA: ROCHA, 2003). Becker (1995) relatou que a capacidade das algas em utilizar o nitrogênio sob forma orgânica depende de sua possibilidade de assimilar o composto inteiro, ou de desaminá-lo e utilizar a amônia formada.

3.3. Parâmetros de crescimento microalgal

A taxa de crescimento diária média da microalga nos experimentos pode ser observada na Tabela 2. A taxa média até o início da fase estacionária foi de $0,62 \pm 0,003$ divisões dia^{-1} , obtendo, dessa forma, um crescimento exponencial durante esta fase, o que não ocorreu posteriormente, uma vez que até o oitavo dia de cultivo, o crescimento foi negativo ($- 0,011 \pm 0,001$ divisões dia^{-1}), ocorrendo claramente por conta do declínio na concentração de nutrientes. Esta taxa negativa de crescimento refletiu no conteúdo de biomassa algal, o qual foi diminuindo até o oitavo dia de $2,28 \pm 0,06$ para $2,23 \pm 0,03$ g L^{-1} . Deste modo, em relação aos parâmetros de crescimento, o cultivo até o início da fase estacionária já seria suficiente, não necessitando sua continuação por mais tempo.

Segundo Lourenço (2006), é na fase exponencial (log) que o cultivo atinge rendimento final máximo, com o maior número possível de células por mililitro de cultivo. Após esta fase, a taxa de crescimento tende a se tornar estável e é sempre baixa, se comparada com as fases anteriores, com valores próximos de zero, dessa forma, a duração da fase log depende da disponibilidade de nutrientes essenciais e de luz. A redução drástica de qualquer nutriente essencial como o nitrato pode eliminar a fase de crescimento log, bem como o auto-sombreamento excessivo causado pela elevada densidade celular.

Foi observado que no decorrer do tempo houve uma redução na concentração de nitrato ao mesmo tempo em que a produtividade microalgal aumentava, devido à assimilação do nitrato do meio de cultivo pela microalga,

visto que o referido composto é um dos nutrientes essenciais ao crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006).

TABELA 2. Parâmetros de rendimento cinético das culturas de *T. tetrathele* em dois momentos da curva de crescimento.

Fase de cultivo	Taxa de crescimento K (divisões dia ⁻¹)	Biomassa algal (g L ⁻¹)	Produtividade lipídica v (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	Rendimento lipídico Y (g 100g de alga seca ⁻¹)
Até o início da estacionária	0,62 ± 0,003	2,28 ± 0,06	1,29 ± 0,08	31 ± 1,3
Até o fim da estacionária	- 0,01 ± 0,001	2,23 ± 0,03	0,69 ± 0,02	39 ± 3,2

Okauchi e Kawamura (1997) determinaram um meio ótimo para o crescimento de *Tetraselmis tetrathele* em larga escala modificando as concentrações de nutrientes no meio Guillard f/2. Eles observaram baixas taxas de crescimento que variaram entre 0,011 e 1,28 divisões dia⁻¹, devido à deficiência de nitrogênio, fosfato e excesso de cloreto de magnésio.

Zitelli et al. (2006) analisaram a produtividade e a eficiência fotossintética da microalga *T. suecica* e obtiveram taxas de crescimento de até 2,13 ± 0,35 divisões dia⁻¹. Esta relativa alta taxa de crescimento ocorreu por conta da elevada luminosidade, uma vez que os cultivos foram realizados externamente em fotobioreatores tubulares, submetidos à radiação solar. Ohse et al. (2008) analisando o crescimento celular de varias microalgas em sistema autotrófico, observou que as espécies *T. chuii* e *T. suecica*, obtiveram também taxas de crescimento de 1,28 ± 0,12 e 1,54 ± 0,08 divisões dia⁻¹, respectivamente.

Meseck et al. (2005) observaram o efeito de diferentes intensidades luminosas e fotoperíodos na taxa de crescimento da microalga *Tetraselmis chuii* e encontraram valores de até 0,61 ± 0,04 divisões dia⁻¹, semelhante às encontradas no presente trabalho.

3.4. Rendimento e produção lipídica

Segundo Olgúin et al. (2001) o conteúdo de lipídios em microalgas é influenciado por fatores nutricionais e ambientais. O rendimento lipídico no início da fase estacionária foi de $31 \pm 1,3$ g 100 g de alga seca⁻¹, enquanto que no fim desta mesma fase só ocorreu um aumento de $08 \pm 2,4$ g 100 g de alga seca⁻¹ (Tabela 2). Desta forma, foi observado que ocorreu, até o início da fase estacionária, um acúmulo de lipídios três vezes maior. O acúmulo de lipídios em células microalgais é mais efetivo quando ocorre uma redução ou limitação de nutrientes no meio de cultivo. Segundo Falkowski e Raven (1990), a característica de muitas microalgas de armazenar grandes conteúdos de lipídios de reserva se deve a uma resposta evolutiva, ou seja, a seleção natural favoreceu as espécies que possuem a capacidade de armazenar reserva energética para sobreviver em períodos desfavoráveis.

A produtividade foi melhor no início da fase estacionária, sendo obtido um rendimento de $1,88 \pm 0,03$ g L⁻¹ dia⁻¹, cerca de cinco vezes maior do obtido na fase mais avançada. Assim, também em termos de produção lipídica, é mais viável realizar cultivos somente até o início da fase estacionária, ou seja, logo que a limitação de nutrientes for efetiva, uma vez que se pode obter maior quantidade de lipídios em menor espaço de tempo, neste caso, de apenas quatro dias.

Khotimchenko e Yakovleva (2005) investigaram a influência de diferentes intensidades luminosas na produção de lipídios da alga vermelha *Tichocarpus crinitus*. Os autores observaram que em baixa intensidade luminosa (até 5 klux), o conteúdo de lipídios chegou a valores de 23,41 e 12,2 g 100g de alga seca⁻¹. Os autores relataram ainda que a luminosidade é um fator ambiental que influencia significativamente no conteúdo de lipídios e na composição de ácidos graxos das células, devido ao fornecimento de energia para o metabolismo fotossintético. Em baixa luminosidade, ocorre acumulação de lipídios estruturais como fosfatilglicerol, fosfatidicolina e

monogalactosildiacylglicerol e em alta luminosidade, ocorre o acúmulo de lipídios de reserva como os triglicerídios.

Converti et al. (2008) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas e diferentes concentrações de nitrogênio no rendimento da biomassa e de lipídios em várias espécies de microalgas. Cultivando a microalga *Chlorella vulgaris* na temperatura de 25°C, os autores observaram os melhores resultados de produtividade lipídica, a qual foi de $20,2 \pm 0,60 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Na mesma temperatura foi encontrado também o melhor rendimento de lipídico ($14,71 \pm 0,30 \text{ g } 100\text{g de alga seca}^{-1}$). Os autores observaram que para a microalga *N. Oculata*, os melhores resultados ocorreram na temperatura de 15°C, obtendo produtividade lipídica de $9,1 \pm 0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e rendimento de $14,92 \pm 0,82 \text{ g } 100\text{g de alga seca}^{-1}$.

Ainda de acordo com Converti et al. (2008), com relação à concentração inicial da fonte de nitrato, os melhores resultados para *Chlorella vulgaris* foram encontrados adicionando 0,375 g de nitrato de sódio na solução base, sendo obtido uma produtividade lipídica de $20,3 \pm 0,40 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e rendimento lipídico de $15,31 \pm 0,51 \text{ g } 100\text{g de alga seca}^{-1}$. Os autores observaram que a microalga *N. oculata* produziu mais lipídios com a adição apenas de 0,075 g de nitrato de sódio, obtendo produtividade de $16,4 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e rendimento de $15,86 \pm 0,59 \text{ g } 100\text{g de alga seca}^{-1}$.

O efeito de diferentes concentrações de ferro (Fe^{3+}) na produção de lipídios em culturas de *C. vulgaris* foi avaliado por Liu et al. (2008). Os autores obtiveram o maior conteúdo de lipídios quando houve a adição de ferro na concentração de $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ durante a fase exponencial de crescimento.

Futuros estudos, mais detalhados, serão realizados com objetivo de caracterização dos lipídios encontrados no início e no fim da fase estacionária de crescimento de *T. tetrathele* e poderão indicar quais os diferentes tipos de lipídios, bem como investigar a utilização desses compostos, seja na área de alimentação ou de biocombustíveis e ou outras.

4. CONCLUSÃO

O acompanhamento da concentração de nitrato no cultivo se mostrou uma ótima alternativa para a estimativa da concentração de nutrientes no meio de cultivo da microalga *Tetraselmis tetraathele*. Em relação à produção de lipídios, pode-se concluir que microalga *T. tetraathele* acumula mais lipídios até o início da fase estacionária, sendo o momento ideal para se realizar a coleta das células microalgais para posterior extração lipídica.

REFERÊNCIAS

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 293p. 1995.

BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 475-479, 1997.

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

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.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behaviour of protein preparation from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, n. 1-3, p. 181-192, Nov.2000.

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.

FALKOWISK, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic Photosynthesis**. Oxford: Blackwell Science, 375p, 1990.

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.

GRAVILESCU, M. CHRISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances.**, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, Nov. 2005.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 160-186, Mar. 2006.

KALIN, M.; WHEELER, W. N.; MEINRATH, G. The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. **Journal Environmental Radioactivity**, v. 78, n. 2, p. 151-177, Oct. 2005.

KHOTIMCHENKO S. V.; YAKOVLEVA I. M. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. **Phytochemistry**, v. 66, n.1, p.73-79, Jan. 2005

KIRSCHBAUM, M. U. F. To sink or burn? A discussion of the potential contributions of forests to greenhouse gas balances through storing carbon or providing biofuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, n. 4-5, p. 297-310, May. 2003.

LIU, Z, Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4717–4722, Jul.2008.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, v. 1, 588 p. 2006.

MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P end metal removal: a review. **Biometals**, v. 15, n. 4, p. 337-390, Dec. 2002.

MATHUMOTO, Y.; YASUMOTO, S.; YOSHIDA, N. Culture of *Artemia salina* by use of *Tetraselmis tetrahele*. **Bulletin of the Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries**, v. 14: p. 47–50, 1988.

MESECK, S. L.; ALIX, J. H.; WIKFORDS, G. H. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 293-404, May, 2005

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research.**, v. 40, n. 15, p. 2799-2815, Aug. 2006.

OHSE, 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.

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

OKAUCHI, M.; KAWAMURA, K. Optimun médium for larg-scale culture of *Tetraselmis tetrathele*. **Hydrobiologia**, v. 358, n. 1-3, p. 217-222, Dec. 1997.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 906pp. 2001.

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

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

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

SURESH, B.; RAVISHANKAR, G. A. Phytoremediation – anovel and promising approach for environmental clean-up. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 2-3, p. 97-124, 2004.

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. 2006.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.3-19. 2004.

TONON, T.; HARVEY, D.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 15–24, Sept. 2002.

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.

ZITTELLI, G.C.; RODOLF, L.; BIOND, N. TREDICI, M.R. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. **Aquaculture**, v. 261, n. 3. p. 932-943, Dec, 2006.