

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

**Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na prospecção de microalgas  
propícias para a produção de biodiesel**

RODRIGO FERNANDO PEPINO

SÃO CARLOS

2011

RODRIGO FERNANDO PEPINO

**Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na prospecção de microalgas  
propícias para a produção de biodiesel**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira

SÃO CARLOS

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P422dp

Pepino, Rodrigo Fernando.

Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na  
prospecção de microalgas propícias para a produção de  
biodiesel / Rodrigo Fernando Pepino. -- São Carlos :  
UFSCar, 2013.  
103 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2011.

1. Ficologia. 2. Lipídios. 3. Microalga. 4. Biodiesel. I.  
Título.

CDD: 589.3 (20<sup>a</sup>)

**Rodrigo Fernando Pepino**

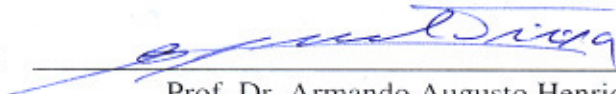
**Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na prospecção de microalgas propícias para a produção de biodiesel**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

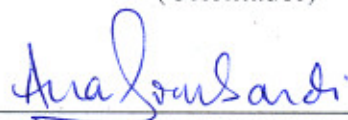
**Aprovada** em 26 de agosto de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira  
(Orientador)

1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
PPGERN/UFSCar

2º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vanessa Colombo Corbi  
UNIARA/Araraquara-SP

## RESUMO

A principal fonte para o biodiesel tem sido os compostos químicos denominados triacilglicerídeos (TAGs). O Isolamento de microalgas com alto rendimento lipídico é a chave para o sucesso da produção de biodiesel a partir de biomassa algal. Desta forma faz-se necessário uma busca não somente por organismos que atendam tal exigência, mas também por técnicas eficazes que nos auxiliem na investigação destes. No presente estudo foram apresentadas algumas metodologias úteis na caracterização da produção de lipídeos por microalgas, tais como as espectroscopias de FTIR e RMN e a espectrofluorimetria com o corante Vermelho do Nilo. A técnica de espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) vem sendo muito utilizada nos estudos de sistemas biológicos, devido a sua rapidez de análise, obtenção de dados sem tratamento prévio e facilidade na caracterização bioquímica de células intactas. Foi proposto neste trabalho, uma otimização da técnica de FTIR para utilização em microalgas, como um método prático de prospectar concomitantemente uma grande quantidade de espécies de microalgas com finalidade de produção de biodiesel. A fluorescência por vermelho do Nilo tem sido aplicada com sucesso na determinação de lipídeos em microalgas. Desta forma a quantidade de lipídeos (neutros) foi determinada pela fluorescência em 430-570nm, e feita uma correlação linear com os dados obtidos por gravimetria. Após prospecção de várias espécies do banco de culturas do laboratório, foi selecionada a microalga de água doce *Scenedesmus* sp (Clone MJ13) para um estudo de caso em condições normais de cultivo e sob condições de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo. Os resultados

demonstraram uma rápida resposta metabólica da *Scenedesmus* sp às mudanças na disponibilidade de nutrientes e indicam a eficiência da espectroscopia de FTIR como um método confiável e rápido para a determinação de produção lipídica em um processo de prospecção.

Palavras chave: triacilglicerídeos, lipídeos, microalga, *Scenedesmus* sp, biodiesel,

Vermelho do Nilo, RMN, FTIR

## ABSTRACT

The chemical compounds called triacylglycerides (TAGs) have been the main source for biodiesel. The isolation of high lipid yield microalgae is important for the success of algae biomass production for biodiesel and, therefore, a search not only for organisms that fulfill such profile, but also for techniques effective in rapid lipid detection is fundamental. A number of methodologies on the characterization of microalgae lipid production, such as FTIR and RMN spectroscopy and spectrofluorimetry using the Nile Red dye are presented in this study. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) technique have been largely used in biological system studies due to its rapid analysis, no pretreatment data gathering and easy biochemical characterization of intact cells. This study proposes a technical optimization of the FTIR technique for microalgae usage purposes as a practical approach for concomitantly prospecting large amounts of microalgae species with focus on biodiesel production. The Red Nile fluorescence has been successfully applied in microalgae lipid determination. In this research, the lipid (neutral) amount was determined by fluorescence in 430-570nm and a linear correlation established with the data gathered through gravimetry. After prospecting a number of species from the laboratory's stock cultures, the freshwater microalgae *Scenedesmus* sp (Clone MJ13) has been selected for study under traditional growth practices and under conditions of different nitrogen and phosphorus concentrations. The results showed a fast metabolic answer of *Scenedesmus* sp to the nutritional availability and the efficiency of the FTIR spectroscopy as a fast and reliable method for the determination of lipid production in a prospecting process.

Keywords: Triacylglycerides, lipids, microalgae, *Scenedesmus* sp, biodiesel, Nile Red, NMR, FTIR



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais tipos de vibrações moleculares. Os sinais + e - indicam vibrações perpendiculares ao plano do papel (Stuart, 1996).....**33**
- Figura 2** - Espectros de um padrão de proteína (albumina bovina), carboidrato (amido) e triacilglicerídeo (trioleína em piridina – Sigma-Aldrich). Em cada espectro tem-se a absorção de suas bandas características identificadas .....**35**
- Figura 3** - Caracterização da microalga *Scenedesmus* MJ13, na região do infravermelho, com 15 dias de crescimento em condições normais de cultivo e sob a condição de estresse. As setas indicam os principais picos de absorção observados nesta amostra .....**37**
- Figura 4** - Decaimento do sinal de RMN com  $T_2$  curto (como de proteínas, carboidratos e água de hidratação) e decaimento com  $T_2$  mais longo (como água livre e óleo em sementes).....**39**
- Figura 5** - Ilustração da sequência CPMG .....**41**
- Figura 6** - Ilustração da sequência de decaimento após a aplicação de n pulsos de  $180^\circ$  .....**41**
- Figura 7** - Diferenças nas curvas de decaimento dos sinais de CPMG, referentes ao tempo de relaxação  $T_2$ , da linhaça (A), soja (B), macadâmia (C) e mamona (D) .....**44**
- Figura 8** - Sinal do decaimento CPMG das microalgas obtidas. As análises foram realizadas nas seguintes condições: pulso de rf ( $90^\circ$  e  $180^\circ$ ) de 11,1 e 21,1  $\mu$ s, respectivamente, na frequência de ressonância, n = 200 ecos, tempo de eco ( $\tau$ ) = 600  $\mu$ s,  $T_r$ = 1,5 s e 16 aquisições, a partir de 0,20g de biomassa seca.....**47**
- Figura 9** - Teor de óleo estimado a partir dos sinais obtidos por RMN de baixo campo, usando a curva padrão do óleo de café e a do óleo de fevilha .....**50**
- Figura 10** - a) Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* MJ13, por concentração de clorofila-a, em meio WC completo aerado com ar e em meio aerado com mistura de 4% de  $CO_2$  em ar. b) Curvas de crescimento da *Scenedesmus* sp MJ13, por densidade celular, em meio WC completo aerado com ar e em meio aerado com mistura de 4% de  $CO_2$  em ar.....**53**
- Figura 11** - a) Curva de assimilação de carbono orgânico da microalga *Scenedesmus* MJ13, em relação a sua curva de crescimento obtida por incremento de clorofila-a. b) Curva referente ao carbono orgânico dissolvido no meio WC da cultura de *Scenedesmus* MJ13.....**56**
- Figura 12** - Curva de nitrogênio total dissolvido no meio de cultura WC, em relação à curva de crescimento da microalga *Scenedesmus* MJ13 obtida por incremento de clorofila-a .....**58**
- Figura 13** - Correlação entre absorbância em 681 nm e densidade celular para *Scenedesmus* MJ13 .....**61**
- Figura 14** - Curva analítica obtida através de leitura em espectrofluorímetro, de diluições sucessivas do padrão de trioleína, para quantificação de lipídeos neutros .....**65**
- Figura 15** - Curva analítica obtida através de leitura em espectrofluorímetro, de uma densidade fixa de  $1,5 \times 10^6$  da microalga *Scenedesmus* sp na presença de diferentes concentrações de trioleína .....**66**
- Figura 16** - Comparação do teor de lipídios, em 4 cepas de microalgas, determinado pelo método de fluorescência vermelho do Nilo e pelo método gravimétrico proposto por Bligh Dyer (1959). Os comprimentos de onda de excitação e emissão de fluorescência utilizados foram de 530 nm e 575 nm,

respectivamente. Os dados foram expressos como médias e desvios-padrão obtidos de determinações em triplicata.....	<b>68</b>
<b>Figura 17</b> - Cinética de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> MJ13 por incremento de clorofila-a (a) e $D.O_{681nm}$ (b) em função do tempo de cultivo e de exposição às diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo referente à primeira etapa experimental. A seta indica a idade da cultura quando o meio WC foi trocado pelos meios com diferentes concentrações de N e P.....	<b>70</b>
<b>Figura 18</b> - Cinética de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> MJ13 por incremento de clorofila-a (a) e $D.O_{681nm}$ (b), em função do tempo de cultivo e de exposição às diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo referente à segunda etapa experimental. A seta indica a idade da cultura quando o meio WC foi trocado pelos meios com diferentes concentrações de N e P.....	<b>71</b>
<b>Figura 19</b> - Variação dos valores médios de pH do cultivo de <i>Scenedesmus</i> MJ13, crescendo em diferentes concentrações de N e P. a) Primeira etapa experimental; b) Segunda etapa experimental. A seta indica a idade da cultura quando o meio WC foi trocado pelos meios com diferentes concentrações .....	<b>73</b>
<b>Figura 20</b> - Espectros no infravermelho de <i>Scenedesmus</i> MJ13 referentes a primeira etapa experimental. (a) Meio controle composto por WC completo, (b) Meio WC com concentração de N/2, (c) Meio WC com concentração de N/4, (d) Meio WC com concentração de P/2, Meio WC com concentração de P/4. Cada figura apresenta uma análise Comparativa de suas principais absorções, de 1950 a 900 $cm^{-1}$ , através da normalização do sinal em 1550 $cm^{-1}$ referente à produção de biomassa .....	<b>76</b>
<b>Figura 21</b> - Espectros no infravermelho de <i>Scenedesmus</i> MJ13 referentes a segunda etapa experimental. (a) Meio controle composto por WC completo, (b) Meio WC com concentração de NP/25, (c) Meio WC com concentração de NP/50, (d) Meio WC com concentração de NP/100, Meio WC NP=0, sem nitrogênio e fósforo. Cada figura apresenta uma análise comparativa de suas principais absorções, de 1950 a 900 $cm^{-1}$ , através da normalização do sinal em 1550 $cm^{-1}$ referente à produção de biomassa.....	<b>77</b>
<b>Figura 22</b> - Estrutura química de um triacilglicerol insaturado com radicais carboxílicos diferentes. À esquerda da molécula: glicerol. A direita da molécula, de cima para baixo: ácido palmítico, ácido oléico, ácido alfa-linolênico.....	<b>83</b>
<b>Figura 23</b> - Espectros normalizados da <i>Scenedesmus</i> MJ13, referentes a primeira etapa experimental, em diferentes dias de crescimento e sob a condição de diferentes concentrações de N e P, mostrando os sinais de absorção na região de 1745 $cm^{-1}$ em cada tratamento realizado .....	<b>84</b>
<b>Figura 24</b> - Espectros normalizados da <i>Scenedesmus</i> MJ13, referentes a segunda etapa experimental, em diferentes dias de crescimento e sob a condição de diferentes concentrações de N e P, mostrando os sinais de absorção na região de 1745 $cm^{-1}$ em cada tratamento realizado .....	<b>85</b>
<b>Figura 25</b> - Correlações dos teores de óleo estimados a partir do método gravimétrico proposto por Bligh & Dyer (1959) e a razão das intensidades dos sinais de FTIR em 2930/1550 $cm^{-1}$ , referentes a primeira etapa experimental.....	<b>92</b>
<b>Figura 26</b> - Correlações dos teores de óleo estimados a partir do método gravimétrico proposto por Bligh & Dyer (1959) e a razão das intensidades dos sinais de FTIR em 2930/1550 $cm^{-1}$ , referentes à segunda etapa experimental.....	<b>93</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Meio de cultura WC, de Guillard & Lorenzen 1972 .....	22
<b>Tabela 2</b> - Composição percentual de ácidos graxos em óleos vegetais .....	43
<b>Tabela 3</b> - Lista de algas prospectadas no primeiro processo de seleção por produção de óleo .....	46
<b>Tabela 4</b> - Tempos de decaimento obtidos do ajuste biexponencial das curvas de decaimento de diferentes sementes .....	48
<b>Tabela 5</b> - Tempos de decaimento obtidos do ajuste biexponencial das curvas de decaimento de algumas das microalgas estudadas .....	49
<b>Tabela 6</b> - Média das razões entre as intensidades das bandas em 1740/1540 $\text{cm}^{-1}$ e 2920/1540 $\text{cm}^{-1}$ , calculadas a partir dos espectros de FTIR (análises feitas em duplicatas) .....	51
<b>Tabela 7</b> - Valores médios referentes à concentração de carbono orgânico da microalga <i>Scenedesmus</i> MJ13, cultivada em meio WC aerada com mistura de 4% de $\text{CO}_2$ em ar .....	55
<b>Tabela 8</b> - Valores médios referentes à concentração de nitrogênio total da microalga <i>Scenedesmus</i> MJ13, cultivada em meio WC aerada com mistura de 4% de $\text{CO}_2$ em ar .....	57
<b>Tabela 9</b> - Valores relacionados à curva analítica construída através das diluições e leitura em espectrofluorímetro do padrão de trioleína .....	64
<b>Tabela 10</b> - Valores expressos por porcentagem em biomassa seca, obtidos através dos métodos fluorimétrico com vermelho do nilo e gravimétrico por Bligh & Dyer (1959), assim como seus respectivos desvios e erro relativo referente a comparação dos dois métodos .....	68
<b>Tabela 11</b> - Razão das intensidades dos sinais de $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$ em função do tempo, referentes a primeira etapa experimental, para cada tipo de tratamento realizado .....	78
<b>Tabela 12</b> - Razão das intensidades dos sinais de $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$ em função do tempo, referentes a segunda etapa experimental, para cada tipo de tratamento realizado .....	79
<b>Tabela 13</b> - Média das razões entre as intensidades das bandas em 1745/1550 $\text{cm}^{-1}$ e 2930/1550 $\text{cm}^{-1} \pm$ o desvio padrão, calculadas a partir dos espectros de FTIR (análises feitas em duplicatas), teor de óleo estimado a partir do método gravimétrico proposto por Bligh-Dyer (1959) e correlação linear entre o teor de óleo obtido e a razão das bandas 2930/1550 $\text{cm}^{-1}$ .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASTM American Society for Testing and Materials

°C Graus Celsius

CG Cromatografia Gasosa

Chl a Clorofila a

CPMG Sequência Carr-Purcell-Meiboom-Gill

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucléico

D.O. Densidade ótica

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias

FTIR *Fourier Transformed Infra Red*

$\delta$  Deslocamento químico (RMN) / deformação angular (IV)

$\lambda$  Comprimento de onda

ha Hectares

Hz Hertz

K Taxa de crescimento

mL Mililitro

mg/L Miligrama por litro

$\mu$ L Microlitro

$\mu$ g/L Micrograma por litro

$\mu$ mol Micromolar

$\mu$ s Micro segundos

nm Nanômetros

rpm Rotações por minuto

RMN Ressonância Magnética Nuclear

TAG Triacilglicerídeo

Ton Toneladas

UFSCar Universidade Federal de São Carlos

WC Wright's Cryptophyte medium

WDCM World Data Center for Microorganisms

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL .....	20
3.2 MICRORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO .....	20
3.3 PREPARAÇÃO DA VIDRARIA.....	21
3.4 MEIO DE CULTURA.....	22
3.5 ACLIMATAÇÃO.....	23
3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	23
3.7 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	24
3.7.1 <i>Contagem de células ao microscópio ótico/Curva de crescimento</i> .....	24
3.7.2 <i>Determinação da densidade celular da <u>Scenedesmus MJ13</u> através de espectrofotometria.....</i>	25
3.8 ANÁLISES.....	25
3.8.1 <i>pH</i> .....	25
3.8.2 <i>Clorofila-a</i> .....	26
3.8.3 <i>Carboidrato</i> .....	26
3.8.4 <i>Carbono orgânico e nitrogênio total</i> .....	26
3.8.5 <i>Determinação do teor de lipídeos totais</i> .....	27
3.8.6 <i>Método fluorimétrico do Vermelho do Nilo</i> .....	27
3.8.7 <i>FTIR</i> .....	28
3.8.8 <i>RMN</i> .....	29
3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA LIMITAÇÃO DE N E P.....	29
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE FTIR E RMN NO ESTUDO DE MICROALGAS .....	31
4.1.1 <i>Espectroscopia de FTIR</i> .....	31
4.1.2 <i>Espectroscopia de RMN</i> .....	38
4.2 PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES POR TÉCNICAS DE FTIR E RMN .....	45
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA <u>SCENEDESMUS MJ13</u> .....	52
4.4 CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM CELULAR E DENSIDADE ÓTICA .....	59
4.5 CORRELAÇÃO ENTRE FLUORESCÊNCIA E MEDIDAS QUANTITATIVAS DE LIPÍDEOS NEUTROS .....	62
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA LIMITAÇÃO DE N E P NA MICROALGA <u>SCENEDESMUS SP</u> , CLONE MJ13 .....	70
4.6.1 <i>Impacto no crescimento celular</i> .....	70
4.6.2 <i>Impacto no pH do meio de cultivo</i> .....	72
4.6.3 <i>Caracterização da microalga <u>Scenedesmus sp</u> por espectroscopia de FTIR</i> .....	74
4.6.4 <i>Caracterização do sinal em 1745 cm<sup>-1</sup></i> .....	82
4.7 COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE FTIR COM O MÉTODO DE BLIGH-DYER (1959).....	89
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A principal fonte para os substitutos do óleo diesel, como o biodiesel, tem sido os óleos vegetais e gorduras animais, que são compostos químicos denominados triacilglicerídeos (TAG). Há pelo menos quatro rotas tecnológicas que estão sendo estudadas para a substituição do óleo diesel por derivados TAG: o uso do óleo vegetal virgem (“in natura”); o emprego dos produtos da pirólise dos TAG (semelhante ao craqueamento do petróleo), a conversão dos TAG em mono-ésteres de ácidos graxos pelo processo de transesterificação (produto denominado oficialmente de biodiesel) e o H-Bio, patente da Petrobras, que consiste na hidrogenação total dos TAG. Algumas dessas tecnologias estão bem avançadas e já há várias empresas comercializando desde unidades de produção de biodiesel, para uso local, com produção de alguns litros por hora, até unidades de grande porte com produção de milhares de litros/dia.

No entanto, há dois graves problemas quanto à utilização de óleos vegetais que poderão retardar ou dificultar o uso desses óleos como combustível.

O primeiro problema é em relação à produtividade de óleo das espécies de plantas cultivadas. Hoje, as principais fontes de óleos vegetais para biodiesel são: a soja, mamona, girassol, algodão, amendoim, pinhão manso que produzem menos ou até cerca de 1 tonelada de óleo por hectare por ano. Isso leva a um balanço energético menor que 2, ou seja, a energia produzida é apenas pouco maior que a energia gasta para sua produção. Assim, a produtividade dessas plantas não é economicamente e nem energeticamente sustentável e nem suficiente para atender à demanda futura do mercado. O Dendê é a única cultura comercial disponível no país, que tem alta produtividade, com potencial de

produção de mais de 5 ton/ha/ano e balanço energético acima de 5. Entretanto, o dendê só é cultivado na região amazônica, devido a sua alta demanda hídrica.

O segundo problema é relativo à qualidade dos óleos vegetais disponíveis. Os óleos de soja, girassol, algodão etc, têm alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, que são indesejáveis para uso como combustível, pois têm baixa estabilidade química, baixo número de cetano e levam a maior depósito de carbono do que os ácidos graxos monoinsaturados ou saturados (Durrett et al. 2008). Por exemplo, esses óleos não atendem as especificações das normas da ASTM (EUA) e EN (União Européia) para uso na produção de biodiesel (Prestes et al, 2007).

No caso do óleo de mamona, o problema é a alta concentração de ácido ricinoleico (~80%), que tem uma hidroxila no carbono 12 e torna o seu biodiesel muito viscoso, o que pode levar a um rápido entupimento dos filtros de combustível e dos bicos injetores. Novamente, das fontes comercialmente disponíveis, apenas o óleo de dendê atende as norma de qualidade da matéria prima (ASTM, EN) para produção de biodiesel. Assim, há uma demanda crescente e urgente de conhecimento sobre organismos com alta produtividade e alta qualidade de óleo; as microalgas podem ser tais organismos. As microalgas produzem uma enorme e até surpreendente diversidade de compostos lipídicos e, não menos surpreendente, flexibilidade e eficiência na alteração do metabolismo lipídico (Guschina & Harwood 2006). Essas características refletem o fato do termo “microalgas”, na verdade, envolver um enorme conjunto de organismos pertencentes a diferentes linhas filogenéticas com um histórico de evolução para a adaptação às mais variadas condições ambientais existentes na biosfera. Mas, mesmo em organismos estreitamente relacionados



filogeneticamente, ou até mesmo diferentes cepas de uma mesma espécie, a flexibilidade adaptativa a mudanças repentinas nas condições de crescimento é enorme.

Como as plantas, a maior parte dos ácidos graxos sintetizados pelas microalgas está entre C16 e C18, saturados e insaturados, mas os ácidos graxos saturados e mono-insaturados predominam na maioria das algas prospectadas (Borowitzka 1988). Entretanto, ao contrário das plantas, as microalgas apresentam uma grande variação na composição dos seus ácidos graxos; algumas espécies sintetizam ácidos graxos C10, C12 e C14, como algumas cianobactérias, criptofíceas e diatomáceas, enquanto outras diatomáceas e criptofíceas sintetizam ácidos graxos de cadeia longa como C20 ou maior; como se pode ver, ocorre grande variabilidade mesmo dentro de um determinado táxon de microalgas. Mas o que é mais interessante, o número de espécies ou clones perscrutados pode ser considerado baixíssimo frente ao número de espécies existentes (> 50.000 espécies).

Do total do carbono fixado atualmente no planeta, cerca de 45% é devido às microalgas, incluindo todos os táxons a que elas pertencem. Em condições controladas de cultivo de determinadas espécies de microalga o índice de produtividade é bem maior do que aquele obtido em cultivos de plantas com interesse comercial. Teoricamente, um cultivo de microalgas exposto a uma intensidade de  $2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$  (sol do meio dia), o que pode ser obtido facilmente em diversas regi\u00f5es no Brasil, poderia chegar a 110 g de peso seco por  $\text{m}^2$  em 10 horas (Raven 1988). Por\u00e9m, segundo Pirt et al. (1983) a demanda de f\u00f3tons por  $\text{CO}_2$  fixado pode ser bem menor, o que significa que n\u00e3o haveria necessidade de t\u00e3o altas intensidades para se obter esse limite te\u00f3rico. Esses dados s\u00e3o extremamente interessantes, pois capacitam o pa\u00eds para a produ\u00e7\u00e3o de biomassa algal em

praticamente qualquer de suas regiões. Deve-se considerar, também, que microalgas produzem, por unidade de área, de 8 a 25 vezes mais lipídeos para produção de combustíveis do que as plantas (Sheehan et al. 1998). Entretanto, a realidade mostra-nos que a produtividade atual obtida em cultivos de microalgas está, ainda, longe desse limite. Por exemplo, a produtividade de *Spirulina* sp, uma das espécies mais cultivadas em todo o mundo para fins comerciais (não para a obtenção de TAG) está em torno de 50 ton ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

É indiscutível que o sucesso em termos econômicos da produção de biodiesel (e outros combustíveis) a produtividade de óleo por qualquer microalga passa por um profundo estudo da biologia fundamental desses organismos envolvendo biologia molecular e engenharia genética e metabólica, bioquímica de lipídeos, e a biossíntese de TAG relacionada com fatores de estresse e fases do ciclo biológico, por exemplo.

Obviamente na produção de biomassa de microalgas para obtenção de um produto com baixo preço, como é o caso de um litro de óleo diesel, esse fator torna-se mais crítico do que para a obtenção de produtos com alto valor de mercado como toxinas, carotenóides, fármacos, intermediários de química-fina etc. A solução desse problema inicia-se com a resolução de vários problemas intrínsecos aos organismos: respostas à intensidade luminosa e temperatura, identificação dos requisitos nutricionais, fontes de CO<sub>2</sub> e o efeito da movimentação da massa algal (*mixing*). Porém, como é quase óbvio, a abordagem à resolução do problema de obtenção de biomassa deve iniciar-se pela solução do primeiro obstáculo que é a seleção das espécies mais adequadas para a obtenção do produto final, no

caso o óleo, e obter condições de cultivo que aumentem a produção, resolvam o problema do número de cetanos e a estabilidade oxidativa.

As condições de cultivo, como a utilização de fatores de estresse, fazem parte dos procedimentos de prospecção para a seleção das espécies mais propícias. Fatores de estresse que não representem aumento de custos e metodologias viáveis para o estudo de um grande número de algas são, portanto, condições essenciais na seleção das espécies mais apropriadas, o que representa a proposta deste trabalho. Entretanto, para isso há necessidade de se adaptar metodologias que permitam o manuseio de um grande número de espécies em cultivos concomitantes, entre elas métodos rápidos de quantificação preliminar de óleo e aplicação/seleção de fatores de estresse

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Desenvolvimento e adaptação de metodologias de quantificação de óleo que possam ser utilizadas na prospecção e pré-seleção rápida de um grande número de espécies de microalgas propícias para a produção de biodiesel. Uma vez pré-selecionadas as espécie mais propícias, desenvolver condições de cultivos que o aumentem a produtividade de óleo para a produção de biodiesel, produtividade essa também monitorada por metodologias rápidas de quantificação do óleo.

### 2.2 Objetivos específicos

- 01) Avaliar o potencial da utilização da técnica espectroscópica de FTIR na caracterização da produção de TAG.
- 02) Caracterização da produtividade de espécies de microalgas, previamente selecionadas, entre aquelas que produzam maior quantidade de TAG em condições de crescimento normal (sem fatores de estresse).
- 03) Uma vez isoladas, as espécies serão analisadas quanto à sua capacidade de produção de TAG e selecionada a espécie com maior potencial para ser usada como *espécie modelo* em experimentos de aplicação de fatores de estresse visando o incremento da produção de óleo. Avaliar, como fatores de estresse, a influência da adição de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo,

do meio de cultivo, no crescimento e produção de TAG da microalga *Scenedesmus* sp, clone MJ13.

04) Propor um modelo de regressão com objetivo de determinar a densidade celular de *Scenedesmus* sp, clone MJ13.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenvolvimento experimental**

Todo o trabalho experimental ocorreu através de uma parceria entre a UFSCar e a EMBRAPA - Instrumentação Agropecuária. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ficologia, envolvendo o Banco de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar com registro internacional no World Data Center for Microorganisms (WDCM #835).

O Banco, o primeiro (e o maior em diversidade) a ser montado no país (iniciado a partir de 1977), atualmente conta com cerca de 300 cepas de 250 espécies envolvendo Chlorophyta, Cryptophyta, Cyanobacteria, Bacillariophyceae, Chrysophyceae e outras. O Laboratório de Ficologia, onde está inserido a Coleção de Culturas é, provavelmente, um do mais bem equipado no país no que diz respeito à manutenção, crescimento e experimentação de culturas de microalgas.

As análises de óleo (quantitativas e qualitativas) foram efetivadas na EMBRAPA - Instrumentação Agropecuária.

#### **3.2 Microorganismos e meio de cultivo**

Inicialmente foi realizada uma prospecção nas cepas existentes (cerca de 300) no Banco de Culturas do Laboratório de Ficologia da UFSCar (WDCM #835), onde quase todas elas isoladas no estado de São Paulo. Dentre as espécies estudadas neste primeiro estágio estão: *Ankistrodesmus* sp, *Chlamydomonas* sp, *Chlorella minutissima*, *Chlorella*

*vulgaris*, Colônia não identificada (ITA14), *Cryptomonas* sp, *Cyclotella* sp, Diatomácea clone MJ21, Micrococóide clone ITA21, Micrococóide clone ITA23, *Pseudokirchneriella* sp, *Scenedesmus* sp clone MJ13 e *Westella* sp. Os organismos estão em fase de classificação por terceiros (Instituto de Botânica vinculada a Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo).

Após seleção, a microalga usada neste estudo foi a *Scenedesmus* sp. clone MJ13, uma Chlorophyta da ordem Chlorococcales, família Scenedesmaceae. As culturas foram feitas em meio WC (Guillard & Lorenzen 1972) ou, quando necessário, em meio WC modificado.

### **3.3 Preparação da vidraria**

Toda a vidraria utilizada para o cultivo das microalgas foram lavadas previamente com água e sabão, em seguida imersas em um banho de potassa quente (solução de KOH), por 24h, depois, transferidas para um banho em HCl 10%, por no mínimo 4 horas, enxaguadas com água destilada e secas em estufa. Os frascos utilizados nos cultivos foram vedados com algodão, recobertos com papel para a esterilização. Foram utilizados ainda rolhas e mangueiras de silicone, barbante, gaze, pipeta, papel alumínio e papel Kraft.

### 3.4 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para cultivo das microalgas foi o meio de cultura WC (Wright's Cryptophyte) desenvolvido por Guillard & Lorenzen (1972). A composição do meio está descrita na Tabela 1. Após o preparo, o meio foi autoclavado a 121°C por 35 minutos. O pH final deste foi de  $7,0 \pm 0,1$ .

**Tabela 1.** Meio de cultura WC, de Guillard & Lorenzen 1972.

Reagentes	Solução Estoque (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Meio de Cultura
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,8	1 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	37,0	1 mL
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	12,6	1 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	11,4	1 mL
NaNO <sub>3</sub>	85	1 mL
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	21,2	1 mL
Solução de ferro	(g 1000 mL <sup>-1</sup> de água destilada); Na <sub>2</sub> EDTA = 4,36; FeCl <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O = 3,15	1 mL
Solução de micronutrientes	(g 1000 mL <sup>-1</sup> de água destilada); CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O = 0,01; ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O = 0,022; CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O = 0,01; MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O = 0,18; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O = 0,006; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> = 1	1 mL
Solução de vitaminas	(g 1000 mL <sup>-1</sup> de água destilada); Tiamina HCl = 0,1; Biotina = 0,0005	1 mL
Água destilada		1000 mL

Fonte: Guillard & Lorenzen, 1972



Em certo período do desenvolvimento experimental, durante a fase estacionária foi utilizado o meio WC com limitações de N e P, como forma de depleção. Neste meio foi utilizado como suplemento o tiosulfato de sódio, sob concentração de  $500\text{mg L}^{-1}$ , a fim de se otimizar o rendimento lipídico da microalga (Mandal & Mallick, 2009).

### **3.5 Aclimação**

Antes do início dos experimentos, a partir dos tubos de cultura estoque do banco de algas do laboratório, foram desenvolvidas culturas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, nos quais foi realizada a aclimação química e física às condições de cultivo. Esta aclimação foi desenvolvida durante uma semana, permitindo assim que as microalgas estivessem adaptadas quando então foram empregadas como inóculo, sempre em fase exponencial de crescimento.

### **3.6 Condições de cultivo**

Na fase de prospecção e caracterização de espécies, os cultivos das microalgas foram feitos em frascos de cultura cilíndricos de 2L com 1,8L de meio WC completo. Para o estudo do efeito das limitações por nitrogênio e fósforo (estresse nutricional) foram feitas culturas em frascos de 9 litros (PYREX) com 8 litros de meio WC. Em todos os casos, as condições de cultivo foram: radiância de  $150\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (quantificada por Quantameter QSL-100, Biospherical Instruments) providas por lâmpadas fluorescentes tipo *luz do dia* com fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro) e temperatura  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , com agitação manual todos os dias. As culturas foram borbulhadas com uma mistura de 4%  $\text{CO}_2$  em ar

(White Martins) filtrada (0,2  $\mu\text{m}$ ), com um fluxo contínuo de  $200\text{mL min}^{-1}$  ( $\text{L min}^{-1}$  calibrado a 706 mm/Hg a  $21^\circ\text{C}$ ). As culturas não apresentavam substâncias tamponantes, como  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  (TRIS), e durante o cultivo o pH não foi controlado, mas seus valores foram registrados regularmente.

### **3.7 Medidas de crescimento**

#### *3.7.1 Contagem de células ao microscópio óptico / Curva de crescimento*

O crescimento das culturas foi estimado pelo número de células/mL obtido por contagem ao microscópio óptico (Mcalice, 1971). Foram acrescentadas duas gotas da solução de lugol a 1 mL da cultura (fixação da cultura). Estas foram mantidas ao abrigo da luz e conservadas em geladeira.

Após homogeneização em agitador tipo vórtex por 30 segundos, a amostra foi transferida para a câmara de Fuchs-Rosenthal, para contagem ao microscópio óptico. Após sedimentação por dez minutos foram contadas todas as células presentes nos campos até que se obtivesse 300 células, em cada campo, sendo estimada a densidade da cultura (células/mL).

### *3.7.2 Determinação da densidade celular de *Scenedesmus sp*, clone MJ13 através de espectrofotometria*

Com o objetivo de dinamizar a determinação da densidade celular nos cultivos, avaliou-se a correlação entre a quantidade de células (em células/mL) obtida por contagens na câmara Fucks Rosenthal e a absorbância óptica (medida em espectrofotômetro) dos cultivos de MJ13 em meio WC. Estes testes foram realizados em triplicata.

Os padrões de equivalência do número de células e dos valores de absorbância foram definidos através da quantificação do número de células em câmara de contagem e da leitura da absorbância da amostra. Desta forma, é necessário conhecer o espectro de absorção da amostra que se quer determinar, fazendo-se uma varredura em todo o espectro da região do uv-visível. No método espectrofotométrico a leitura da absorbância em espectrofotômetro, utiliza um comprimento de onda específico para cada espécie utilizada como organismo-teste. Portanto, a determinação do comprimento de onda foi efetuada através da observação do maior valor de leitura dentro de uma faixa de 600 a 800 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Hach, modelo DR 5000

## **3.8 Análises**

### *3.8.1 pH*

A determinação do pH das culturas foi realizada através de leitura direta na amostra em pHmetro digital (Digimed DM-22).

### 3.8.2 *Clorofila-a*

A quantificação de clorofila-*a* foi realizada após extração com etanol 90% a quente (Nusch, 1980), seguindo as recomendações de Marker et al. (1980) e as equações de Lorenzen (1967).

Um volume de 5 ml de amostra foi filtrada através de uma membrana de fibra de vidro GF/C, com poro de 1,2  $\mu\text{m}$ . Os filtros foram armazenados a  $-5^{\circ}\text{C}$  no escuro por no máximo 30 dias. No momento da extração, os filtros foram acondicionados em tubos de plástico, adicionados aproximadamente 4 mL de etanol 90% a  $80^{\circ}\text{C}$  e macerados com um bastão de vidro. O macerado foi deixado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas para a separação da fibra de vidro e o volume do sobrenadante foi medido e armazenado em tubos limpos para a leitura em espectrofotômetro a 665 e 750 nm.

### 3.8.3 *Carboidratos*

A concentração de carboidratos dissolvido foi determinada pelo método fenol-sulfúrico, como descrito por Dubois et al. (1956).

### 3.8.4 *Carbono orgânico e Nitrogênio Total*

As concentrações de carbono orgânico e nitrogênio das amostras foram realizadas através de um aparelho analisador (TOC-Vcph, Shimadzu) equipado com módulo TNM-1 para análise de nitrogênio total das amostras. Foram realizadas análises da amostra total, e

da fração dissolvida da amostra ( $<0,22 \mu\text{m}$ ). A fração particulada foi estimada como a diferença entre a fração total e a fração dissolvida.

### *3.8.5 Determinação do teor de lipídeos totais*

Os lipídeos foram extraídos com clorofórmio-metanol-água de acordo com Bligh e Dyer (1959). Os extratos foram transferidos para frascos previamente calibrados, o clorofórmio evaporado a  $60^{\circ}\text{C}$ , e os lipídeos secos por 3 horas a  $100^{\circ}\text{C}$ . Por fim, sua massa foi determinada para quantificar o teor de lipídeos.

### *3.8.6 Método fluorimétrico do Vermelho do Nilo*

Para o estudo de acúmulo de lipídeos neutros, foi utilizado o método do Vermelho do Nilo, um corante de fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  que fluoresce em comprimentos de onda definidos, dependendo da polaridade do meio circundante. Este tem sido proposto para determinar o teor de lípídeos neutros de microalgas. As células foram coletadas e coradas de acordo com os métodos de coloração para microalgas já descritos por Cooksey et al., (1987); Priscu et al., (1990); Lee et al., (1998); Elsey et al., (2007); Chen et al., (2009) e otimizados de acordo com a nossa necessidade.

Por amostragem, 3 mL da suspensão algal foi corada com 10  $\mu\text{L}$  de  $7,8 \times 10^{-4}$  M de solução de Vermelho do Nilo dissolvido em acetona com 25% de DMSO, obtendo uma concentração final de 0,26  $\mu\text{M}$ . As amostras foram incubadas a  $40^{\circ}\text{C}$  por 10 min, e depois foram deixadas no escuro a temperatura ambiente por mais 30 min. Depois que as células

das algas foram coradas, as emissões de fluorescência foram registradas em um espectrofotômetro JASCO, modelo FP-6500.

De acordo com a verificação de pré-excitação e emissão de características dos padrões de lipídios neutros, os comprimentos de onda de excitação e emissão selecionados foram de 530 nm e 575 nm, respectivamente.

A solução de Vermelho do Nilo é foto sensível, portanto deve-se evitar exposição à luz intensa durante o preparo e processo de coloração. Seu armazenamento deve ser no escuro. Em virtude disso, foram preparadas pequenas quantidades de solução estoque deste corante e armazenadas por no máximo 20 dias a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.7 FTIR

Para as análises de FTIR, as células foram retiradas por centrifugação a  $1500 \times g$  a  $10^{\circ}\text{C}$  e lavadas em solução salina 0,5%, centrifugadas novamente, congeladas e liofilizadas. Utilizou-se um espectrofotômetro da PERKIN-ELMER modelo Spectrum 1000. Foram preparadas pastilhas com 1 mg de amostra da microalga e 100 mg de KBr, seco em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ . As pastilhas foram prensadas, sob vácuo, por 2 minutos com uma carga equivalente a 6 toneladas. Os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras no intervalo de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  com resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros de infravermelho de todas as amostras foram obtidos em duplicata (preparando-se duas pastilhas para cada microalga) e para a representação gráfica destes resultados foi obtido à média dos valores de absorbância em cada comprimento de onda de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.8.8 RMN

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro RMN de bancada (Spin Lock) modelo SLK-SG-100 (0,23 Tesla ou 10 MHz para  $^1\text{H}$ ). As análises foram realizadas utilizando-se o software CONDOR IDE e a sequência de pulsos CPMG, com um porta amostra de volume útil  $6\text{ cm}^3$ . As análises foram realizadas nas seguintes condições: pulso de rf ( $90^\circ$  e  $180^\circ$ ) de 11,1 e 21,1  $\mu\text{s}$ , respectivamente, na frequência de ressonância,  $n = 200$  ecos, tempo de eco ( $\tau$ ) = 600  $\mu\text{s}$ ,  $T_r = 1,5\text{ s}$  e 16 aquisições.

### 3.9 Delineamento experimental para limitação de N e P como fator de estresse

O estudo sobre a limitação de N e P foi dividido em duas etapas experimentais. Foi aplicado um delineamento trifatorial  $2 \times 5 \times 5$ , sendo duas etapas experimentais (fator 1), cinco dias de observação do efeito de “starvation” (fator 2) e cinco tipos de tratamento quanto a disponibilidade de N e P (fator 3), totalizando 50 combinações de fatores. Foram desenvolvidos experimentos do tipo blocos, com duas repetições (dois blocos – em datas diferentes – contendo todas as combinações).

Na primeira etapa, quando as culturas atingiram a fase estacionária do crescimento (15º dia) o meio de cultura foi trocado, através de centrifugação contínua em uma centrífuga Contifuge Heraeus, por meio WC fresco contendo  $500\text{mg L}^{-1}$  de tiosulfato de sódio, mas com limitações de N e P em sua composição. Com base no meio WC proposto por Guillard & Lorenzen (1972), estas limitações foram: N/2; N/4; P/2; P/4 (onde N e P

referem-se à quantidade total de nitrogênio e fósforo na formulação do meio WC), acompanhadas por um meio controle sem alteração da quantidade de N e P.

Da mesma forma que na primeira etapa, na segunda etapa experimental, quando as culturas atingiram a sua fase estacionária, o meio de cultura foi repostado por meio WC, contendo  $500\text{mg L}^{-1}$  de tiosulfato de sódio, com outras limitações de N e P em sua formulação. Neste caso as limitações foram: NP/25; NP/50; NP/100; NP=0 (meio WC sem nitrogênio e fósforo), também acompanhadas por um meio controle sem alteração da quantidade de N e P.



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Utilização da técnica espectroscópica de FTIR e RMN no estudo de microalgas**

A composição bioquímica das microalgas além de variar de acordo com a espécie, a quantidade de luz fornecida, temperatura e fase de desenvolvimento também contribui para mudanças na estrutura molecular destes organismos. No nível mais simples estes organismos são compostos por água, lipídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e pequenas moléculas. As microalgas são citadas como produtoras de ácidos graxos poliinsaturados em sua fração lipídica, com 1 a 40% de lipídeos e em determinadas condições de cultivo, podem-se obter valores mais elevados.

Estes lipídeos são formados por estruturas complexas, variando sua composição de acordo com cada espécie, então se investigou diferentes gêneros e espécies deste grupo de organismo por técnicas de FTIR e RMN, no objetivo de se verificar a aplicabilidade destas metodologias, investigando a existência de características espectrais das células intactas, que os diferenciassem sem a necessidade de se extrair os lipídeos.

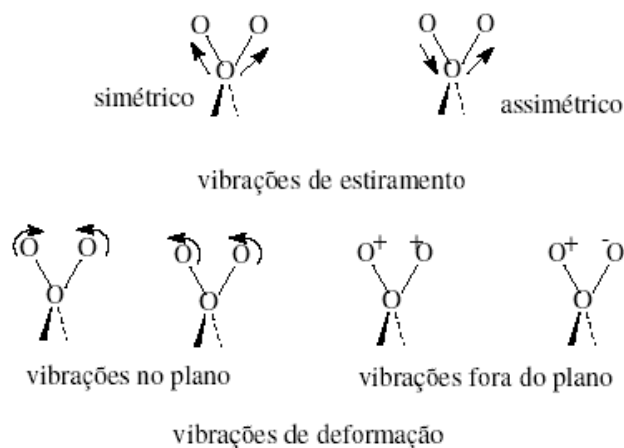
#### *4.1.1 Espectroscopia de FTIR*

Através da técnica de FTIR é possível estudar os efeitos da variação do meio de cultura na variação da composição química das células em função do tempo de cultura. Além disso, é possível em alguns casos a análise quantitativa através de modelos matemáticos (Vanini 1996).

Algumas das vantagens em se utilizar a técnica de FTIR para caracterizar microrganismos são: rapidez da análise, identificação de grupos funcionais característicos de componentes presentes em sua composição ou produtos metabolizados por esses organismos, a possibilidade de obtenção de dados sem a necessidade de tratamento prévio de separação e purificação dos componentes químicos presentes nas células (Naumann, 2000). Devido a estas e outras vantagens da técnica de FTIR, esta é muito utilizada no estudo de sistemas biológicos e até como método de taxonomia bacteriana (Naumann, 2000). Neste trabalho é proposto um modelo de sua utilização no estudo e caracterização de microalgas.

A radiação de infravermelho é a parte do espectro eletromagnético entre a região do visível e das microondas, com número de onda entre  $14290$  e  $200\text{ cm}^{-1}$ . A região de maior interesse para a espectroscopia é de  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ . As posições das bandas no espectro de infravermelho são apresentadas em número de ondas, cuja unidade é o centímetro inverso ( $\text{cm}^{-1}$ ) e é proporcional à energia de vibração (Silverstein et al., 1994).

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que os diversos tipos de ligações químicas e de estruturas moleculares existentes numa molécula absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, em comprimentos de onda característicos e, como consequência, os átomos envolvidos entram em vibração. Dois tipos fundamentais de vibrações moleculares podem ser distinguidos: o estiramento, onde os átomos vibram no mesmo eixo, variando a distância entre eles e a deformação, onde a posição dos átomos em vibração muda em relação ao eixo da ligação (Stevenson, 1994). Os principais tipos de vibrações de estiramento e de deformação estão ilustrados na Figura 1.



**Figura 1.** Principais tipos de vibrações moleculares. Os sinais + e - indicam vibrações perpendiculares ao plano do papel (Stuart, 1996).

O resultado do espectro infravermelho contém uma variedade de bandas que podem indicar diferentes grupos funcionais presentes no material em estudo (Stevenson, 1994; Silverstein et al., 1994). De forma geral, notam-se nos espectros, de todos os microrganismos estudados, as seguintes características (Naumann, 2000):

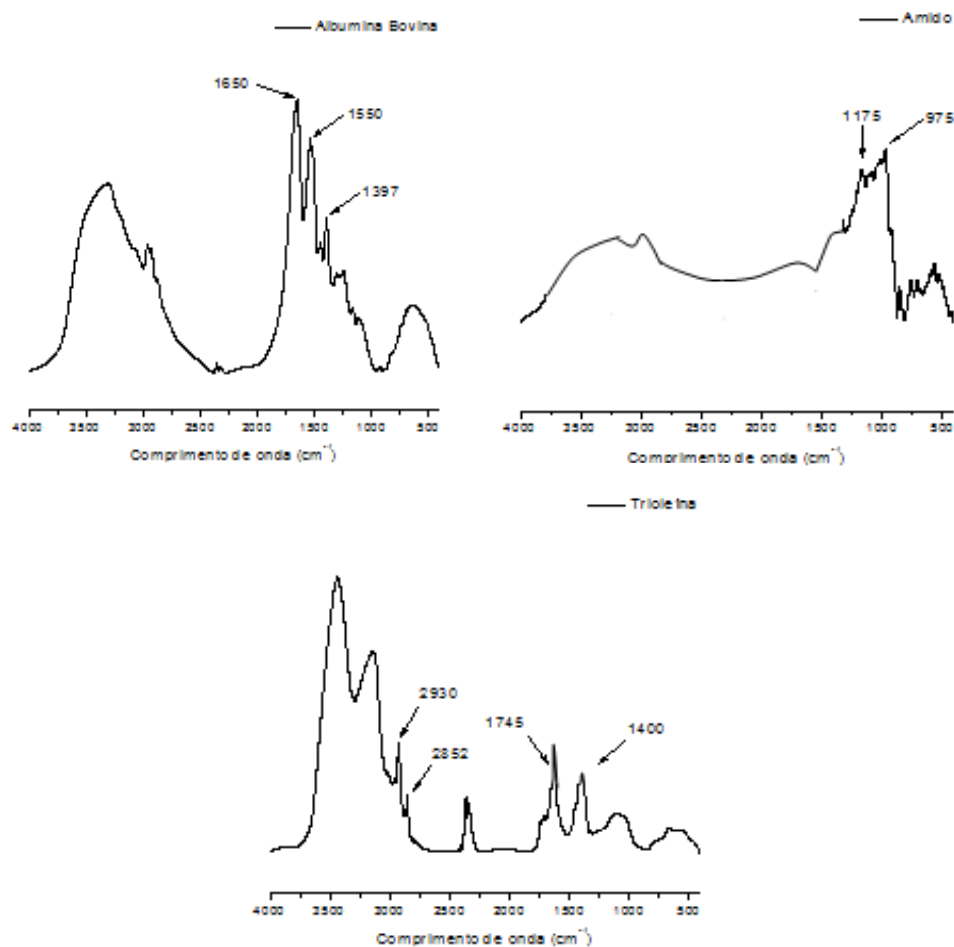
- 01) Sinais entre  $2930$  e  $2858\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de lipídeos);
- 02) Próximo de  $1740\text{ cm}^{-1}$ , estiramento vibracional  $\text{C}=\text{O}$  de grupo funcional éster de lipídeos;
- 03) Observa-se uma propriedade marcante nos espectros das microalgas cultivadas em meio com depleção de nutrientes, que é a grande intensidade relativa do sinal em  $2930\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo  $\text{CH}_2$  de lipídeos, quando comparados aos espectros de outras microalgas cultivadas em condições normais, sendo esta

uma característica comum da composição química destes organismos sob a condição de estresse nutricional;

- 04) Entre 1300 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  tem-se uma absorção de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de vibração angular de lipídeos e proteínas;
- 05) Uma fraca absorção em torno de 1400  $\text{cm}^{-1}$ , sendo esta devido a estiramento simétrico de  $\text{COO}^-$  de cadeias laterais de aminoácidos e ácidos graxos livres;
- 06) Em torno de 1230  $\text{cm}^{-1}$  tem-se estiramento da ligação  $\text{P}=\text{O}$  de fosfatos de fosfolipídeos ou contidos em alguns carboidratos;
- 07) Em 1070  $\text{cm}^{-1}$  tem-se uma absorção devida a estiramentos vibracionais de ligações do tipo  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  e  $\text{C}-\text{O}-\text{P}$  de vários oligo e polissacarídeos.

Dessas bandas, as localizadas nas regiões de 1740, 2930 e 1550  $\text{cm}^{-1}$  serão o principal foco na caracterização das microalgas, uma vez que representam sinais característicos de ácidos graxos e triacilglicerídeos.

Para um melhor entendimento dos espectros de FTIR de células microbiais é necessário uma percepção geral de sua composição, tipo de célula, estruturas química presente e conhecimento da diferenciação de células. Desta forma fez-se necessário a padronização da aplicabilidade desta técnica na utilização do estudo destes microrganismos (Figura 2).



**Figura 2.** Espectros de um padrão de proteína (albumina bovina), carboidrato (amido) e triacilglicerídeo (trioleína em piridina – Sigma-Aldrich). Em cada espectro tem-se a absorção de suas bandas características identificadas.

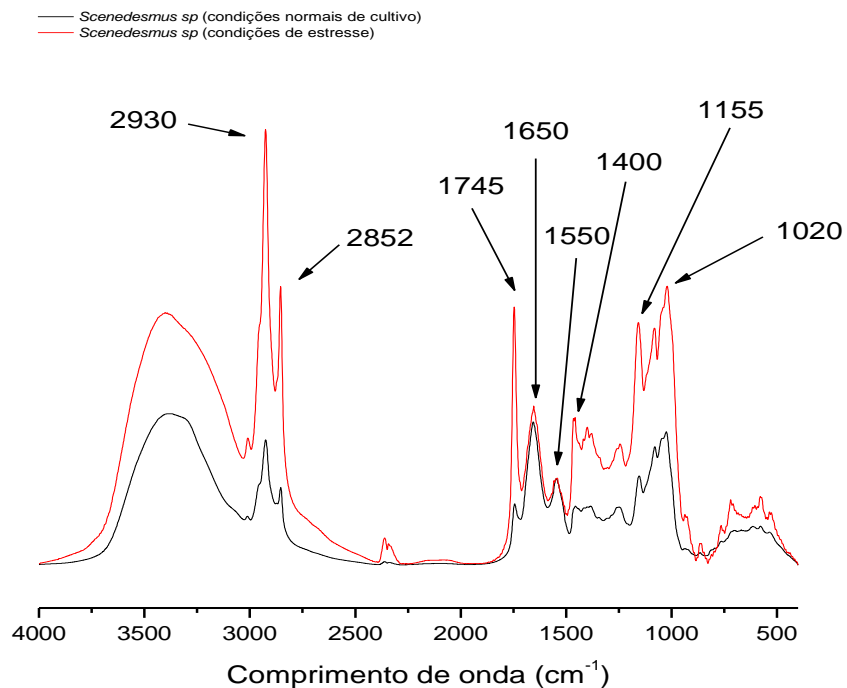
Todos os espectros apresentam características individuais para cada tipo de absorção. Esta diferenciação é possível, através da análise de cada pico de absorção indicado. No espectro de albumina bovina, temos sinais característicos de estruturas que indicam a presença de proteína na amostra. O pico identificado em 1650 cm<sup>-1</sup> e 1550 cm<sup>-1</sup>, referem-se a bandas de amida I e amida II respectivamente. Estas bandas são utilizadas para identificar a predominância de estruturas  $\alpha$  ou  $\beta$  de proteínas. A banda representada em

1397  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações de estiramento simétrico do grupo  $-\text{COO}^-$  da cadeia lateral de aminoácidos.

Ainda na figura 2, no espectro do amido indentificam-se uma sequência complexa de picos de 1200 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , devido principalmente as vibrações de estiramento C-O-C característica de polissacarídeos, destaque para as absorções em 1175 e 975  $\text{cm}^{-1}$ . Já no espectro de trioleína, o de maior referência para este trabalho, temos a absorção de 4 bandas distintas. Em 2930  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao estiramento C-H (assimétrico) de  $\text{CH}_2$  presente em ácidos graxos, o sinal 2852  $\text{cm}^{-1}$  representa o estiramento C-H (simétrico) de  $\text{CH}_2$  também presente na estrutura de ácidos graxos. A banda de absorção em 1745  $\text{cm}^{-1}$  é relacionada a vibrações de estiramento C=O do grupo funcional éster presente na estrutura de triacilglicerídeos e por fim, em 1400  $\text{cm}^{-1}$ , esta banda pode ser atribuída à vibrações de estiramento simétrico do grupo  $-\text{COO}^-$  presente ácidos graxos.

A figura 3 ilustra o espectro da *Scenedesmus* MJ13 sob condições normais de cultivo e sob a condição de estresse. Nela são identificados os principais picos de absorção desta microalga, apresentando uma boa relação com as absorções apresentadas pelos padrões de proteína, carboidrato e lipídeo.

Os espectros de FTIR da microalga *Scenedesmus* MJ13 apresentam bandas características e intensas na região de 1745  $\text{cm}^{-1}$  atribuída aos grupos ésteres (C=O) dos triacilglicerídeos, entre 2930 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  que estão relacionadas aos grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  de cadeias alifáticas, em 1650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , relativa ao teor de proteínas na amostra.



**Figura 3.** Caracterização da microalga *Scenedesmus* MJ13, na região do infravermelho, com 15 dias de crescimento em condições normais de cultivo e sob a condição de estresse. As setas indicam os principais picos de absorção observados nesta amostra.

Observa-se também em  $1400 \text{ cm}^{-1}$  a absorção de vibrações do grupo  $-\text{COO}^-$  presente em cadeia lateral de aminoácidos, ácidos graxos e exopolissacarídeos e por fim na região de  $1200$  a  $900 \text{ cm}^{-1}$  existe a absorção de vibrações de estiramento simétrico de grupos  $\text{PO}_2^-$  em ácidos nucléicos e uma sequência de picos devido principalmente as vibrações de estiramento C-O-C e C-O-P de oligo e polissacarídeos presentes na amostra.

#### 4.1.2 Espectroscopia de RMN

A técnica de RMN aplicada a sistemas biológicos consiste em um método não invasivo para estudar esses sistemas, por isso é muito utilizada tanto em análises *in vitro* como *in vivo* (Gadian, 1995).

Existem inúmeras aplicações desta técnica, que vão desde estudo de estrutura dinâmica de vírus, composição de bactérias, organelas, membranas, estruturas de proteínas, DNA e polissacarídeos, entre outras (Shuman et al., 1979; Gil, 1987; Gadian, 1995; Beckman, 1995; Dahan-Grobgeld et al., 1998;).

Neste trabalho utilizou-se a técnica de RMN de baixo campo para determinar o teor de óleo das microalgas já listadas, por medidas de relaxometria. Através desta metodologia são analisadas as diferenças dos tempos de relaxação transversal ( $T_2$ ) e longitudinal ( $T_1$ ) dos componentes da amostra. Por esse motivo a análise em baixo campo também é conhecida como Time Domain NMR ou TD-NMR.

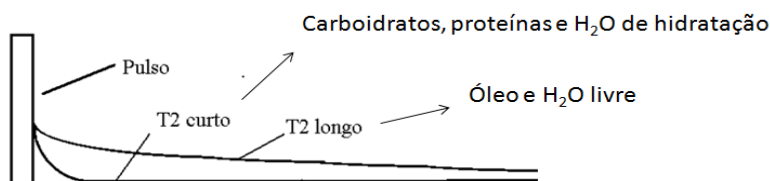
Como a RMN de baixo campo depende do campo magnético principal, que não é homogêneo, a sua maior limitação está relacionada à sensibilidade reduzida. Consequentemente esta técnica se restringe aos isótopos mais sensíveis e abundantes, tais como, o  $^1\text{H}$ , o  $^{19}\text{F}$  e o  $^{31}\text{P}$ . Apesar disso, a RMN de baixo campo tem sido amplamente usada em análises de sementes (Colnago et al., 2007; Prestes et al., 2007) e até mesmo em análises de microalgas (Gao et al, 2008).

Para se conseguir quantificar apenas uma substância presente em uma amostra, que contém vários componentes de um mesmo isótopo em medidas de TD-NMR, os tempos de



relaxação ( $T_1$  e  $T_2$ ) da substância que se deseja quantificar deve ser distintos, em relação aos tempos dos demais constituintes da amostra.

A determinação do teor de óleo em sementes é um exemplo desta condição. Os principais constituintes das sementes oleaginosas, que contêm hidrogênio, são os carboidratos, as proteínas, a água e o óleo. Os sinais de RMN da água livre e do óleo possuem  $T_2$  longo e levam alguns milissegundos para decaírem totalmente. Os sinais dos materiais sólidos, proteínas e carboidratos ou de baixa mobilidade têm  $T_2$  curto (alguns microssegundos) e decaem rapidamente (Figura 4).

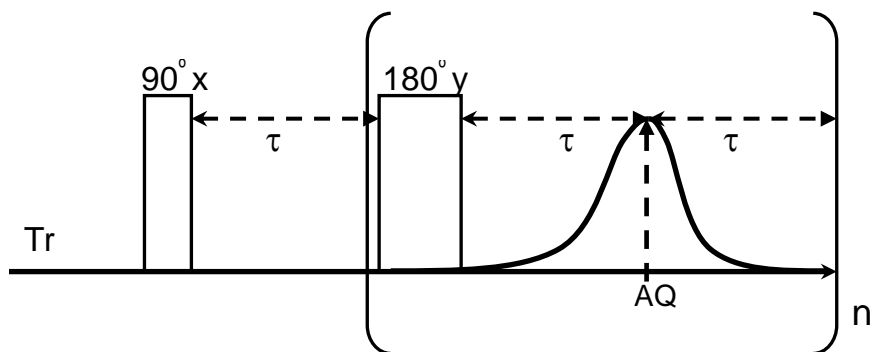


**Figura 4.** Decaimento do sinal de RMN com  $T_2$  curto (como de proteínas, carboidratos e água de hidratação) e decaimento com  $T_2$  mais longo (como água livre e óleo em sementes).

Desta forma, empregando as diferenças de tempo de relaxação entre componentes com diferentes graus de mobilidade, o que implica em tempos de relaxação distintos, a técnica de TD-NMR representa uma maneira rápida e não destrutiva de determinar o teor de óleo e de umidade em amostras oleaginosas intactas (Colnago, 1996).

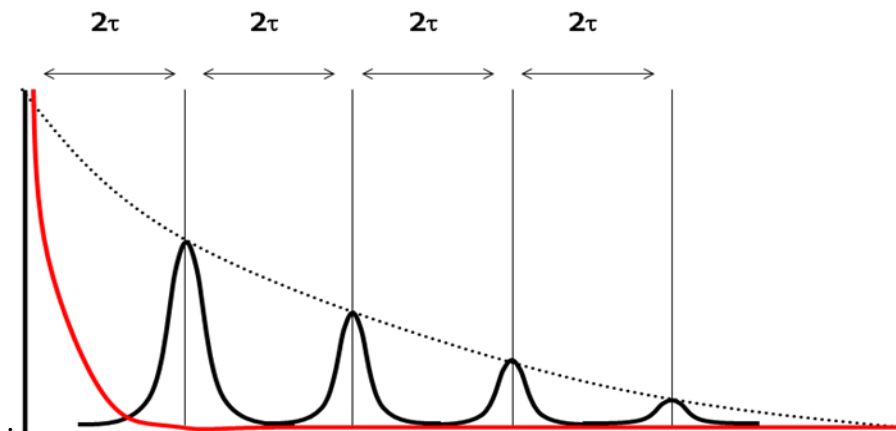
Quando o conteúdo de umidade é menor que 10%, a água contida na amostra é fortemente ligada a uma matriz sólida. Isto reduz sua mobilidade e faz com que seu tempo de relaxação  $T_2$  seja muito curto e não interfira no sinal do óleo. Entretanto, para maiores conteúdos de umidade, há uma percentagem maior de água livre e o sinal da água pode estar presente no sinal do óleo. Como o tempo  $T_2$  da água livre e de óleo não são suficientemente distintos, a água livre deve ser eliminada secando a amostra até 5% de umidade para se determinar o teor de óleo.

A seqüência Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) é um aperfeiçoamento da técnica de eco de spin proposta por Hahn, em 1950. Pelo decaimento exponencial dos sinais (ecos) obtidos utilizando a seqüência de pulsos CPMG obtêm-se a constante de tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) da amostra. Ela consiste em um pulso de 90 graus no eixo x, seguido de um tempo  $\tau$  e um trem de pulsos de 180 graus no eixo y, com um tempo de espera de  $2\tau$  (Figura 5). A aquisição (AQ) dos dados se faz entre os dois tempos  $\tau$ . A seqüência de pulsos de 180 graus é repetida n vezes até o completo decaimento do sinal de RMN, que depende do tempo de relaxação transversal dos componentes da amostra.



**Figura 5.** Ilustração da seqüência CPMG.

Com as repetições desses pulsos de 180 graus a cada  $2\tau$  ( $n$ ), gera-se um sinal de RMN cujo centro de cada eco resulta em um decaimento exponencial cuja constante de tempo é  $T_2$  (relaxação transversal) da amostra, que independe da não-homogeneidade de campo (Figura 6).



**Figura 6.** Ilustração da sequência de decaimento após a aplicação de  $n$  pulsos de  $180^\circ$ .

Em amostras de oleaginosas o valor de  $T_2$  depende da composição e da proporção dos ácidos graxos presentes no óleo. Como, de maneira geral, a viscosidade aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e diminui com o aumento da insaturação do ácido graxo com o mesmo número de carbono, o valor de  $T_2$  pode ser utilizado para analisar a qualidade do óleo em amostras intactas.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sementes oleaginosas secas, no domínio do tempo, são compostos por dois sinais exponenciais com constante de tempo muito diferente. O mais rápido, com constante de tempo de  $10^{-5}$  s, é devido ao componente sólido das sementes, que são principalmente as proteínas e os carboidratos. O decaimento de sinal lento, com constante de tempo de  $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  s, é atribuído aos óleos vegetais, que estão em

estado líquido. Por causa dessa grande diferença no tempo de decaimento, o sinal de RMN de sementes oleaginosas secas depois de 100 us, tem sido usado para determinação do teor de óleo.

Também é conhecido que o decaimento do sinal lento, do óleo, pode ser decomposto em mais de uma exponencial, que é um indicativo que diferentes componentes do óleo podem ter diferentes tempos de relaxação. Para medir essas componentes do óleo o sinal de RMN é adquirido com a seqüência CPMG, que é usada para medir o tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) sem a interferência da não homogeneidade do campo magnético. O sinal do decaimento CPMG pode ser ajustado com duas ou mais curvas exponenciais discretas.

Na Figura 7 observam-se as diferenças no sinal de CPMG de sementes oleaginosas secas (linhaça, soja, macadâmia e mamona) medidas na mesma temperatura (22 °C) (Prestes et al., 2007). Estas diferenças no  $T_2$  são relacionadas às diferenças na viscosidade do óleo e conseqüentemente as diferentes composições de ácidos graxos. Em óleos vegetais a viscosidade é dependente da estrutura dos ácidos graxos dos principais componentes.

Normalmente a viscosidade aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e reduz com o aumento do número de instaurações para ácidos graxos com mesmo número de carbonos. Como os principais ácidos graxos dessas sementes são de 18 carbonos (C18) (Tabela 2), as diferenças nas viscosidades podem ser atribuídas aos níveis de insaturação. Isto explica o decaimento mais longo para a linhaça (A), por causa da alta concentração (~60 %) de ácido linolênico (C18:3), e menor viscosidade do óleo (Figura 5). O óleo de soja (B) é rico (~50 %) em ácido linoléico (C18:2), tendo decaimento intermediário e mais

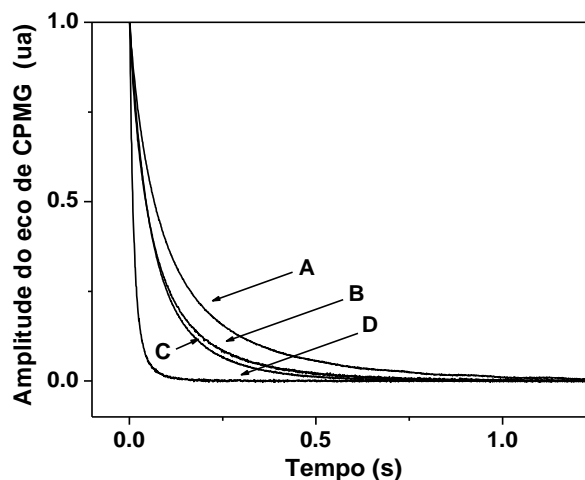
longo do que o observado para a macadâmia (C), que é rico (70 %) em ácido oléico (C18:1).

**Tabela 2.** Composição percentual de ácidos graxos em óleos vegetais

Sementes	16:0	18:1OH	18:0	18:1	18:2	18:3
Soja <sup>1</sup>	2,3-13,3	-	2,4-6	17,7-30,8	49-57,1	2-10,5
Soja <sup>2</sup>	9,6	-	4,4	34,9	51,1	-
Linhaça <sup>1</sup>	6-7	-	3,2-5	13-37	5-23	26-60
Mamona <sup>2</sup>	1,6	84,6	1,2	5,9	6,6	-
<i>Macadâmia</i> <sup>1</sup>	7,9	-	3,5	70,0	1,64	-

<sup>1</sup>Knothe et al., 2006; <sup>2</sup>Rocha et al., 2008

O decaimento CPMG para a mamona (D) é o menor de todos (Figura 8) devido à composição do óleo que tem, aproximadamente, 85 % de ácido ricinoléico (C18:1OH), que tem um grupo hidroxila no C12, que permite ligações de hidrogênio intra-molecular e consequentemente aumentam a viscosidade do óleo.



**Figura 7.** Diferenças nas curvas de decaimento dos sinais de CPMG, referentes ao tempo de relaxação  $T_2$ , da linhaça (A), soja (B), macadâmia (C) e mamona (D).

Além de informações relacionadas à viscosidade do óleo, com o sinal obtido pela sequência CPMG, pode-se determinar a concentração do óleo no material. Essa concentração do óleo é determinada através do cálculo da razão da intensidade do sinal do primeiro eco pela massa da amostra e usando uma curva padrão.

#### 4.2 Prospecções de espécies por técnicas de FTIR e RMN

Durante o primeiro ano deste trabalho, foi realizado no Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos em parceria com a Embrapa Instrumentação Agropecuária, um grande processo de prospecção para seleção de cepas apropriadas para a

utilização de cultivos em massa com a finalidade de produção de biodiesel. As cepas foram isoladas a partir de populações selvagens de ambientes diversificados, mas também foram utilizadas nessa prospecção cepas já existentes em nosso Banco de Culturas de Microalgas de Água Doce, abordando a maior diversidade possível.

Prospecções anteriores mostram que a seleção de espécies apropriadas, para a produção de biodiesel, pode ser uma solução viável para problemas de número de cetano e estabilidade oxidativa encontrados em óleos de plantas prospectadas (Borowitzka 1988). Portanto, a triagem iniciou-se primeiro quanto à produtividade de TAG, selecionando espécies que obtiveram melhores resultados quanto ao acúmulo deste composto, que é um pré-requisito para o sucesso da base tecnológica de produção de biocombustíveis a partir de biomassa algal.

Através da técnica de RMN (Colnago et al, 2007; Prestes et al, 2007) de baixa resolução, foi possível a aquisição de espectros de relaxometria do tipo CPMG (Carr-Purcel-Meiboom-Gill), que quando comparados com uma curva de calibração, permitiram obter os teores de lipídeos destas microalgas prospectadas.

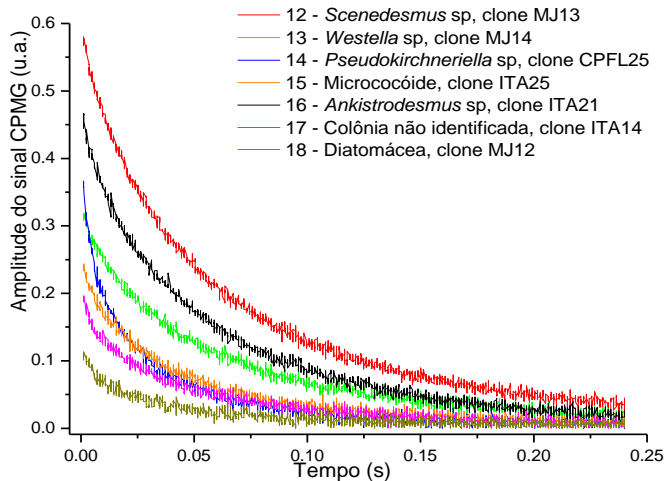
Este primeiro processo de seleção, essencial para a seleção da espécie utilizada como estudo de caso neste trabalho, foi realizado através de três blocos experimentais, conforme a Tabela 3, abaixo.

**Tabela 3.** Lista de algas prospectadas no primeiro processo de seleção por produção de óleo.

<b>Microalga</b>	<b>Classe</b>	<b>Bloco Experimental</b>
<i>Ankistrodesmus densus</i>	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Chlamydomonas</i> sp	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Chloromonas</i> sp	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Chlorella minutíssima</i>	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Chorella vulgaris</i>	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Cryptomonas</i> sp	Cryptophyceae	BLOCO 1
<i>Cyclotella</i> sp	Bacillariophyceae	BLOCO 1
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Scenedesmus</i> sp	Chlorophyceae	BLOCO 1
<i>Ankistrodesmus</i> sp, clone ITA21	Chlorophyceae	BLOCO 2
Colônia não identificada, clone ITA14	-	BLOCO 2
Diatomácea, clone MJ21	Bacillariophyceae	BLOCO 2
Microcócóide, clone ITA21	-	BLOCO 2
<i>Pseudokirchneriella</i> sp, clone CPFL25	Chlorophyceae	BLOCO 2
<i>Scenedesmus</i> sp, clone MJ13	Chlorophyceae	BLOCO 2
<i>Westella</i> MJ14	Chlorophyceae	BLOCO 2
<i>Chlamydomonas</i> sp, clone CPFL26	Chlorophyceae	BLOCO 3
<i>Cryptomonas</i> sp, clone BB01	Cryptophyceae	BLOCO 3
<i>Cyclotella</i> sp, clone BB041	Bacillariophyceae	BLOCO 3

Na Figura 8 são apresentadas as curvas de decaimento CPMG de algumas das microalgas estudadas. Todos os espectros e curvas obtidas de CPMG por RMN de baixo campo estão mantidas no banco de dados do Laboratório de Ficologia da UFSCar e as cepas selecionadas estão catalogadas e mantidas no Banco de Culturas e disponibilizadas, bem como seu histórico e características de produtividade, às unidades produtivas.





**Figura 8.** Sinal do decaimento CPMG das microalgas obtidas. As análises foram realizadas nas seguintes condições: pulso de rf ( $90^\circ$  e  $180^\circ$ ) de 11,1 e 21,1  $\mu\text{s}$ , respectivamente, na frequência de ressonância,  $n = 200$  ecos, tempo de eco ( $\tau$ ) = 600  $\mu\text{s}$ ,  $T_r = 1,5$  s e 16 aquisições, a partir de 0,20g de biomassa seca.

Para a quantificação do teor de triacilglicerídeos a partir destes sinais de decaimento CPMG deve-se construir uma curva de calibração a partir do óleo extraído do material analisado. Porém, neste primeiro momento do estudo, não foi produzida quantidade suficiente de material (massa seca de microalgas) que possibilitasse a extração do óleo e a construção desta curva padrão. Com a ajuda de colaboradores da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária foi feito um estudo prévio dos tempos de decaimento de diferentes sementes para identificar as que apresentam tempos semelhantes às das microalgas estudadas.

Para determinação do tempo de decaimento foi feito um ajuste biexponencial da curva e, portanto, têm-se dois tempos de decaimento denominados  $t_1$  e  $t_2$  que são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Tempos de decaimento obtidos do ajuste biexponencial das curvas de decaimento de diferentes sementes

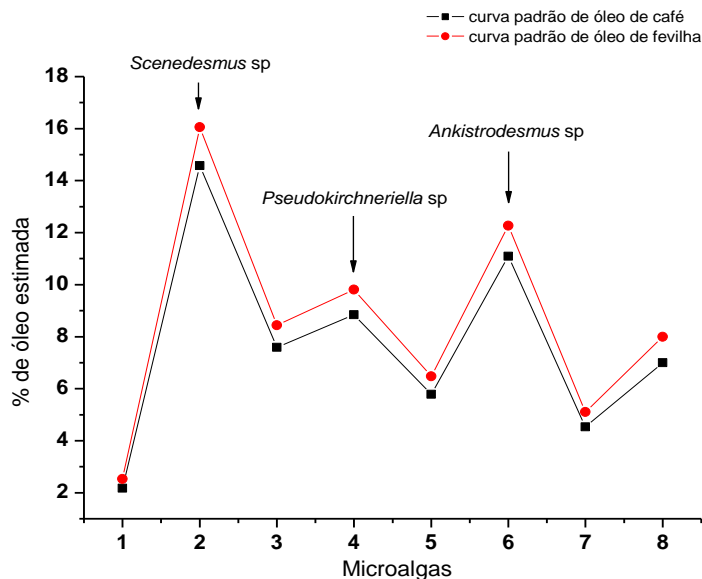
Amostra	Ajuste biexponencial		
	$t_1$ (ms)	$t_2$ (ms)	$R^2$
Nabo forrageiro	92,7	24,9	0,99453
Café	54,6	6,3	0,97945
Soja	100,6	24,6	0,99679
Amendoim	85,6	26,2	0,99775
Castanha do Pará	82,2	14,7	0,99815
Baru	101,7	30,1	0,99668
Gergelim	112,7	35,1	0,99839
Mamona	40	13	0,99813
Fevilha	71	21	0,99809

Na Tabela 5 são apresentados os tempos de decaimento de algumas das microalgas estudadas. Comparando estes tempos de decaimento com os das sementes, observa-se que os tempos dessas microalgas são parecidos com os tempos do óleo de café e da fevilha. Então foram construídas duas curvas padrão uma com óleo de café e outra com óleo de fevilha e a partir destas curvas foi feita a estimativa do teor de óleo das diferentes microalgas.

**Tabela 5.** Tempos de decaimento obtidos do ajuste biexponencial das curvas de decaimento de algumas das microalgas estudadas

Microalgas	t <sub>1</sub> (ms)	t <sub>2</sub> (ms)	R <sup>2</sup>
<i>Chlorella minutíssima</i>	27,9	4,4	0,92398
<i>Scenedesmus</i> sp, clone MJ13	77,7	19,4	0,99828
<i>Westella</i> sp, clone MJ14	71,2	15,1	0,99387
<i>Pseudokirchneriella</i> sp, clone CPFL25	38,8	6	0,99318
Micrococoide, clone ITA23	52,1	10,4	0,98887
<i>Ankistrodesmus</i> sp, clone ITA21	67,4	13,3	0,99701
Colônia não identificada, clone ITA14	56,8	7,8	0,98176
Diatomácea MJ12	45,9	5,3	0,98498

Utilizando as curvas padrão do óleo de café e do óleo de fevilha foi possível estimar o teor de óleo nas microalgas (Figura 09). Todas as algas foram cultivadas em meio WC completo, sob condições normais de crescimento. Os maiores teores encontrados neste bloco experimental foram para as microalgas: *Scenedesmus* MJ13 ( $\approx 16\%$ ), *Ankistrodesmus* sp, clone ITA21 ( $\approx 12\%$ ) e *Pseudokirchneriella* sp, clone CPFL25 ( $\approx 9\%$ ).



**Figura 09.** Teor de óleo estimado a partir dos sinais obtidos por RMN de baixo campo, usando a curva padrão do óleo de café e a do óleo de fevilha.

Em todos os espectros de FTIR obtidos pode-se observar que estas microalgas apresentam a banda na região de  $1740\text{ cm}^{-1}$ , indicando assim a presença dos grupos éster (C=O) e na região de  $2930\text{ cm}^{-1}$ , referente às ligações C–H, bandas estas utilizadas na caracterização de lipídeos nas amostras.

Para a normalização dos espectros e a fim de se obter um padrão interno comparativo da biomassa, foi usado o sinal em  $1550\text{ cm}^{-1}$ , relativo ao teor de proteínas na amostra (Osiro et al., 2004). Assim, a razão entre as intensidades das bandas em  $1740/1550$  e  $2930/1550$ , foi utilizada na identificação e comparação da presença de óleo nas amostras (Tabela 6).

**Tabela 6.** Média das razões entre as intensidades das bandas em  $1740/1540\text{ cm}^{-1}$  e  $2920/1540\text{ cm}^{-1}$ , calculadas a partir dos espectros de FTIR (análises feitas em duplicatas)

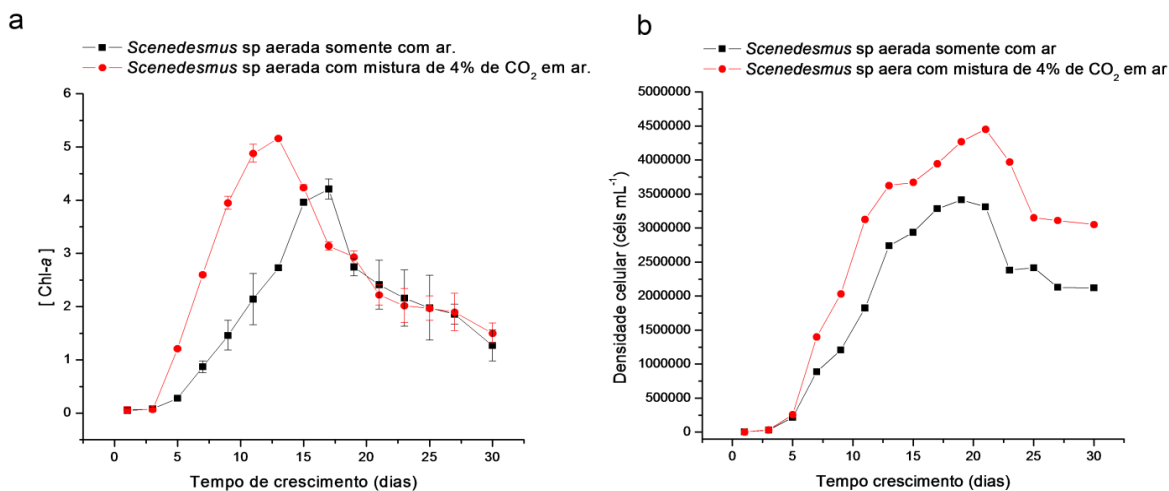
<b>Amostras</b>	<b>1740/1540</b>	<b>2920/1540</b>
Soja	$0,81 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,01$
<i>Nephrocytium lunatum</i>	$0,44 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,03$
<i>Chlamydomonas</i> sp	$0,40 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,05$
<i>Chloromonas</i> sp	$0,24 \pm 0,00$	$0,39 \pm 0,01$
<i>Cryptomonas</i> sp	$0,34 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,05$
<i>Chorella vulgaris</i>	$0,29 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,03$
<i>Chlorella minutíssima</i>	$0,61 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	$0,29 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,01$
<i>Cyclotella</i> sp	$0,25 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,07$
<i>Ankistrodesmus densus</i>	$0,34 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,04$
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	$0,28 \pm 0,00$	$0,46 \pm 0,04$
<i>Scenedesmus</i> sp, clone MJ13	$1,28 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,02$
<i>Westella</i> sp, clone MJ14	$1,05 \pm 0,08$	$2,21 \pm 0,27$
<i>Pseudokirchneriella</i> sp clone CPFL25	$1,09 \pm 0,13$	$2,86 \pm 0,19$
Microcócide, clone ITA23	$1,20 \pm 0,07$	$1,94 \pm 0,13$
<i>Ankistrodesmus</i> sp, clone ITA21	$1,63 \pm 0,10$	$2,48 \pm 0,12$
Colônia não identificada, clone ITA14	$0,76 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,02$

### 4.3 Caracterização da microalga *Scenedesmus* MJ13

Com base no processo de seleção de espécies realizado, foi selecionada a microalga *Scenedesmus* sp, clone MJ13 como estudo de caso deste trabalho. Para um melhor entendimento da dinâmica desta microalga, foram realizados alguns testes para a caracterização deste microrganismo, a fim de se conhecer sua cinética de crescimento e produtividade em diferentes estágios de desenvolvimento.

A Figura 10a mostra as curvas de crescimento obtidas através dos valores de clorofila-*a* em meio WC completo sem o fornecimento de CO<sub>2</sub> e com mistura de 4% de CO<sub>2</sub> em ar, com um fluxo contínuo de 200 mL min<sup>-1</sup>. Nota-se que nas duas condições as curvas de *Scenedesmus* MJ13 apresentam as quatro fases de crescimento bem definidas, de acordo com as medidas da concentração de clorofila: fase lag até o 4º dia; início da fase log (crescimento exponencial) a partir do 4º dia; e em seguida fase estacionária a partir do 12º dia nas culturas onde foram fornecidas a mistura de CO<sub>2</sub> e 15º dia nas culturas que foram borbulhadas somente com ar. Aproximadamente, a partir do 16º dia a microalga já entra em fase de declínio ou senescência (morte celular).

Já na Figura 10b, observamos as curvas de crescimento da *Scenedesmus* MJ13 através dos valores de densidade celular (células mL<sup>-1</sup>). Assim como no gráfico da Figura 11a, neste também se percebe as quatro fases de desenvolvimento. Fase lag até o 4º dia; início da fase log a partir do 5º dia; e em seguida ocorre a tendência na formação de um platô a partir do 15º de idade das culturas nas duas condições, onde este se prolonga até o 20º dia com um leve crescimento celular, dando início então a fase de declínio.



**Figura 10.** a) Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp MJ13, por concentração de clorofila-*a*, em meio WC completo aerado com ar e em meio aerado com mistura de 4% de CO<sub>2</sub> em ar. b) Curvas de crescimento da *Scenedesmus* sp MJ13, por densidade celular, em meio WC completo aerado com ar e em meio aerado com mistura de 4% de CO<sub>2</sub> em ar.

Comparando os gráficos de crescimento obtidos por concentração de clorofila-*a*, e os de densidade celular, nota-se um fato interessante. De acordo com o gráfico da Figura 10a, a partir do 16º dia de idade das culturas, as duas condições já se apresentam na fase de declínio, enquanto que no gráfico da Figura 10b, esta ainda apresenta um moderado crescimento até o 20º dia de idade.

De acordo com Raven et al. (1996) a energia luminosa só pode ser utilizada depois de absorvida pelos pigmentos, sendo assim, o crescimento de microalgas está diretamente relacionado com a taxa de fixação de CO<sub>2</sub> e utilização de energia luminosa fixada. A falta de N e P no meio tornou-se limitante a produção de clorofila, influenciando o

desaceleramento do crescimento celular, pois sem estes nutrientes não ocorre a síntese protéica para a formação de enzimas, inclusive para a síntese de clorofila. Outro fator que também pode estar relacionado com a limitação da produção de clorofila, seria a ausência do íon  $Mg^{+}$ , mas este não foi quantificado neste trabalho.

A partir da fórmula  $K = \frac{Ln_f - Ln_i}{\Delta t}$ , onde K é referente a taxa de crescimento, foram calculados os valores destas taxas da *Scenedesmus* sp no meio WC aerado somente com ar ( $K_1$ ) e WC aerado com mistura de 4% de  $CO_2$  em ar ( $K_2$ ). As taxas de crescimento foram respectivamente  $K_1=1,54$  e  $K_2=1,62$ . Comparando estes valores com os de clorofila-*a*, como seria de se esperar, a principal diferença entre as duas curvas obtidas refere-se às diferenças de biomassa que foi maior nos meios que receberam o suplemento de  $CO_2$ .

Um dos principais problemas nos estudos a respeito da produção lipídica de microalgas esta relacionado à quantidade de biomassa necessária para tal. O dióxido de carbono é a fonte de carbono que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das algas. Em alguns cultivos se faz necessário a adição de  $CO_2$ , pois no ar existem somente 0,03% deste gás. Desta forma, nos próximos experimentos realizados foi adotado a suplementação de 4% de  $CO_2$ , com fluxo contínuo de  $200 \text{ mL min}^{-1}$ , nas culturas da *Scenedesmus* MJ13, afim de se otimizar o seu crescimento e assim obter um maior rendimento de massa algal.

Os dados referentes aos valores da concentração de carbono celular nas diferentes fases do crescimento foram quantificados por meio de um analisador de carbono TOC-



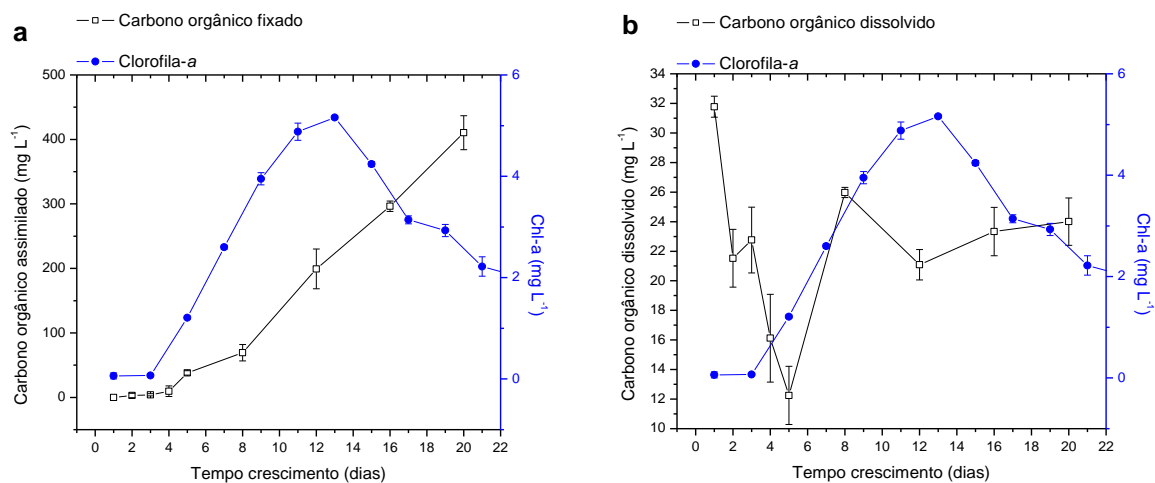
Vcph Shimadzu, equipado com catalizador para baixas concentrações e/ou um analisador elementar (CHNS) Carlo Erba, e estes estão dispostos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores médios referentes à concentração de carbono orgânico da microalga *Scenedesmus* MJ13, cultivada em meio WC aerada com mistura de 4% de CO<sub>2</sub> em ar.

Carbono Orgânico						
Dias	Dissolvido		Total		Assimilado	
	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão (±)	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão (±)	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão (±)
1	31.77	0.71	32.41	2.65	0	0
2	21.52	1.95	24.49	1.44	2.97	3.40
3	22.76	2.22	26.78	0.47	4.02	1.74
4	16.12	2.96	25.62	5.24	9.50	8.21
5	12.25	1.96	50.15	1.47	37.90	3.43
8	25.97	0.34	95.38	13.03	69.41	12.68
10	21.08	1.02	220.30	29.79	199.21	3.82
16	23.33	1.64	319.73	6.54	296.40	8.18
20	24.00	1.60	434.50	24.75	410.50	26.36

A Figura 11a apresenta a assimilação do carbono pela *Scenedesmus* sp, cultivada em meio WC completo aerada com mistura de 4% de CO<sub>2</sub> em ar, assim como a curva de crescimento referente a valores de concentração de clorofila-*a* neste meio.

Analisando a curva de fixação do carbono pela *Scenedesmus* sp em relação a sua curva de crescimento, estes valores indicam que quando a microalga entra em um estágio de crescimento exponencial, ocorre um aumento na captura de carbono orgânico dissolvido no meio (Figura 11b).



**Figura 11.** a) Curva de assimilação de carbono orgânico da microalga *Scenedesmus* MJ13, em relação a sua curva de crescimento obtida por incremento de clorofila-*a*. b) Curva referente ao carbono orgânico dissolvido no meio WC da cultura de *Scenedesmus* sp clone MJ13.

Assimilação de carbono orgânico excretado, na forma de glicolato é relatada em trabalhos anteriores (Watt & Fogg, 1966). No entanto, neste trabalho não foram feitas análises dos compostos excretados. Nesta fase de desenvolvimento a síntese de carboidratos e lipídeos é de caráter estrutural.

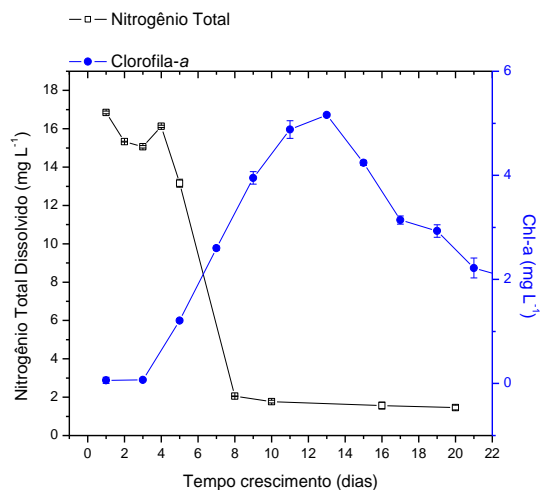
Quando a microalga atinge a fase estacionária de seu crescimento celular, 12º dia de idade da cultura, apesar de ocorrer uma queda nos valores de clorofila os valores referentes a carbono assimilado continuam a crescer. Isto ocorre, pois nas fases estacionária/senescente as microalgas desviam a rota de fixação de carbono, ou a realocação de estoques internos, para compostos ricos nesse elemento, como carboidratos ou lipídeos, como “poço” de carbono ou de elétrons (Vieira & Myklestad, 1986; Alonso et

al. 2000; Mansour et al. 2003; Giroldo & Vieira 2005). Desta forma, nestes estágios de desenvolvimento, a síntese de compostos ricos em carbono não é estrutural, mas para reserva.

O nitrogênio orgânico assimilado foi determinado pela diferença do nitrogênio total presente nas células e meio de cultura e nitrogênio total dissolvido, referente somente ao N disponível no meio de cultura filtrado. A Tabela 8 ilustra as médias dos dados referentes à concentração de nitrogênio nas diferentes fases do desenvolvimento celular.

**Tabela 8.** Valores médios referentes à concentração de nitrogênio total da microalga *Scenedesmus* MJ13, cultivada em meio WC aerada com mistura de 4% de CO<sub>2</sub> em ar.

Dias	Nitrogênio					
	Dissolvido		Total		Assimilado	
	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão (±)	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão (±)	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão (±)
1	16.85	0.07	15.68	0.50	0	0
2	15.33	0.02	16.50	0.65	1.17	0.67
3	15.06	0.06	16.17	0.84	1.11	0.77
4	16.13	0.06	16.60	0.53	0.46	0.60
5	13.16	0.21	16.95	0.31	3.79	0.09
8	2.05	0.02	16.88	1.32	14.82	1.30
10	1.77	0.07	17.62	0.55	15.84	0.47
16	1.56	0.18	16.94	0.70	15.38	0.52
20	1.46	0.12	17.34	0.88	15.88	1.01



**Figura 12.** Curva de nitrogênio total dissolvido no meio de cultura WC, em relação à curva de crescimento da microalga *Scenedesmus* MJ13 obtida por incremento de clorofila-*a*.

Comparando as duas curvas representadas na Figura 12, percebe-se que logo quando a microalga entra em fase logarítmica, ocorre uma grande captura do nitrogênio assimilável disponível no meio. Isto se faz necessário para que ocorra a divisão celular. O nitrogênio é incorporado dentro do microorganismo na síntese de proteínas, sendo que sua ausência acarretaria a diminuição de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor protéico, limitando desta maneira a citocinese, fato este facilmente visualizado entre o 10º e 12º dia de crescimento, quando já não existe praticamente nitrogênio sob forma assimilável, aproximadamente  $1,77 \text{ mg L}^{-1}$ , ocorre a limitação do crescimento da cultura e esta entra na fase estacionária.

O meio preparado para o cultivo influencia diretamente no crescimento celular, bem como na composição química da alga que está em estudo. Os elementos nutritivos mais

importantes são carbono, nitrogênio, fosfato, sais de magnésio, potássio e cálcio. Microelementos como manganês e cobalto atuam favoravelmente em suas atividades vitais.

#### **4.4 Correlação entre contagem celular e densidade ótica**

A metodologia de contagem celular ao microscópio óptico para obtenção da densidade celular de culturas de microalgas é uma técnica tradicional, porém trabalhosa, demorada e que apresenta uma grande variabilidade. Métodos alternativos são propostos na tentativa de estimar, com maior precisão e viabilidade, o crescimento celular.

Vários estudos já foram realizados utilizando a correlação entre contagem celular e a densidade ótica a 680 nm ( $DO_{680}$ ) para monitoramento do crescimento de algas (Tang, Hoagland Siegfried, 1998; Rojioková-Padrťová, 1999; Ma et al., 2001; Scott e Ross, 2001; Ma e Chen, 2005), desde que exista uma boa correlação entre as medidas realizadas e a contagem celular, este método pode ser aplicado. O comprimento de onda 680 nm é o mais utilizado para o monitoramento do crescimento de algumas algas e cianobactérias.

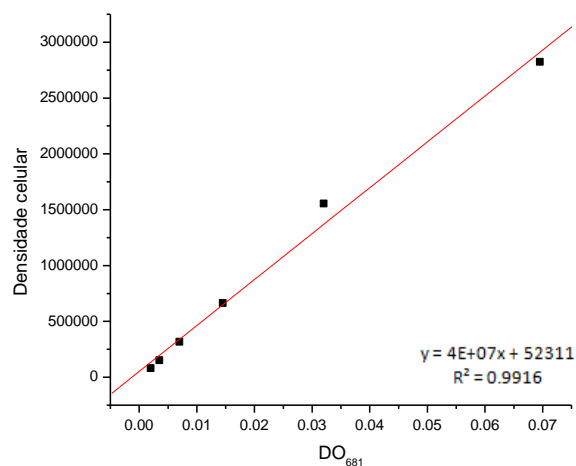
Geis et al. (2000), em seus experimentos com determinação do crescimento algal, concluíram que fluorescência e absorbância apresentam menor coeficiente de variação do que resultados determinados por contagem celular.

Para a confecção da curva padrão de crescimento da *Scenedesmus* MJ13, inicialmente foi feita uma varredura em todo o espectro da região do UV-visível para se

observar a absorvância da microalga. Desta forma, o  $\lambda$  de maior intensidade foi registrado em 681 nm, sendo portanto este o comprimento de onda utilizado na monitoração do crescimento desta alga.

Foram feitas diluições sucessivas de um volume fixo da cultura em fase exponencial de *Scenedesmus* MJ13 com uma concentração celular conhecida, concomitantemente à leitura em espectrofotômetro a 681 nm. Com isso, foi traçada a curva-padrão absorvância x número de células através da qual, o monitoramento do crescimento celular da *Scenedesmus* MJ13, em meio WC, por meio da contagem por microscopia óptica e por densidade óptica a 681 nm apresentou correlação linear de 99,16%, sendo possível a utilização da  $DO_{681}$  para estimar rapidamente o crescimento celular da espécie. A curva de correlação é apresentada na Figura 13.

Todos os valores encontrados na literatura e o valor obtido no presente trabalho, são muito próximos e, de acordo com Hersh & Crumpton (1987) e Fargasová (1996), estão associados a concentrações de pigmentos clorofilados, que apresentam como valor de leitura o comprimento de onda em torno de 664 nm.



**Figura 13.** Correlação entre absorvância em 681 nm e densidade celular para *Scenedesmus* MJ13.

Através da obtenção de uma curva de calibração, para estimativa de densidade celular, correlacionando valores de absorvância e o número de células obtido por contagem, foi determinado um modelo empírico que definiu uma equação de regressão, através do modelo de equação potência por se adequar melhor aos dados obtidos neste trabalho, conforme equação que segue:

$$y = 4 \times 10^7 X + 52311$$

Onde:

y = valores de absorvância;

x = número de células.

#### 4.5 Correlação entre fluorescência e medidas quantitativas de lipídeos neutros

A extração dos lipídios por meio de solvente é um processo físico baseado na transferência dos constituintes solúveis (lipídio) de uma matriz para um solvente com o qual esta matriz esteja em contato. Os lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos da matriz por solvente apolar (como n-hexano), enquanto lipídios polares, os quais estão ligados por forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio, requerem solventes polares (como metanol) capazes de romper tais interações e liberá-los para a extração (Brum et al., 2009).

Na literatura diversos métodos são descritos para extração de lipídios. O método clássico idealizado por Soxhlet em 1879, baseado no refluxo de solvente (como o n-hexano) por algumas horas sobre o material e a metodologia de Bligh & Dyer (1959) que é uma versão simplificada do procedimento clássico usando clorofórmio e metanol proposto por Folch et al. (1957) são amplamente empregados em diferentes matrizes.

Apesar destes métodos de extração de lipídeos serem muito utilizados no estudo de microalgas, estes apresentam algumas inviabilidades para a quantificação de triacilglicerídeos, como a quantidade de biomassa necessária, tempo de análise e também devido ao fato que através da extração por solventes polares, estes carregam consigo todo e qualquer tipo de lipídeo neutro, tais como triacilglicerídeos, glicerídeos, esteróis, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, pigmentos como clorofila e carotenóides, entre outras moléculas.



O Vermelho do Nilo, um corante lipossolúvel fluorescente, tem sido frequentemente empregado para avaliar o conteúdo lipídico de células animais e microorganismos, como células de mamíferos (Genicot et al., 2005), bactérias (Izard e Limberger, 2003), leveduras (Kimura et al, 2004), zooplâncton (Kamisaka et al, 1999), e microalgas (Cooksey, 1987; Eltgroth et al, 2005; Elsey et al, 2007). No entanto, a maioria dos estudos fornecem apenas uma análise qualitativa ou semi-quantitativa dos lipídios.

Das espécies de algas e cepas analisadas pelo método do vermelho do Nilo, a maioria pertencia ao Bacillariophyceae (Cooksey et al, 1987; McGinnis et al, 1997), Xanthophyceae (Eltgroth et al, 2005), Chrysophyceae, Phaeophyceae e com apenas algumas espécies de Chlorophyceae (Lee et al, 1998; Elsey et al, 2007).

Por outro lado, ao longo das últimas décadas, numerosas espécies de algas e estirpes pertencentes às Chlorophyceae foram relatados por conter, com base na extração e análise de solventes convencionais, altos níveis (25-50% do peso seco) de lipídios neutros, sugerindo que esta classe pode representar um grande conjunto de organismos em potencial para se obter lipídios como matéria-prima para produção de biodiesel (Hu et al., 2008).

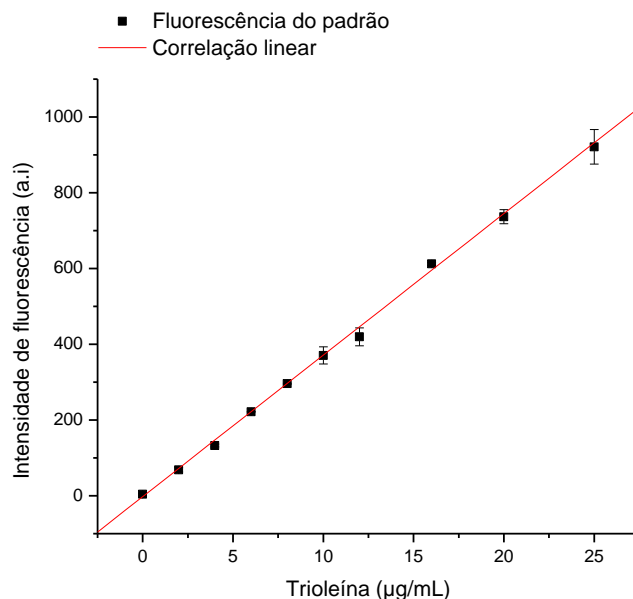
Desta forma através do método de coloração por Vermelho do Nilo, propôs-se a construção de uma curva-padrão como um método alternativo para se estimar, com maior precisão e viabilidade, a quantidade de lipídeos neutros na amostra.

Para este estudo foi construída uma curva analítica através de um padrão de trioleína diluído em piridina (SIGMA-ALDRICH), de concentração de 1000 µg/mL. Após diluições sucessivas do padrão em água, estas foram coradas com 10 µL do corante

vermelho do Nilo. Após o tempo de coloração que o método necessita, foram realizadas as leituras em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação (530 nm) e emissão (575 nm) selecionadas.

**Tabela 9.** Valores relacionados à curva analítica construída através das diluições e leitura em espectrofluorímetro do padrão de trioleína.

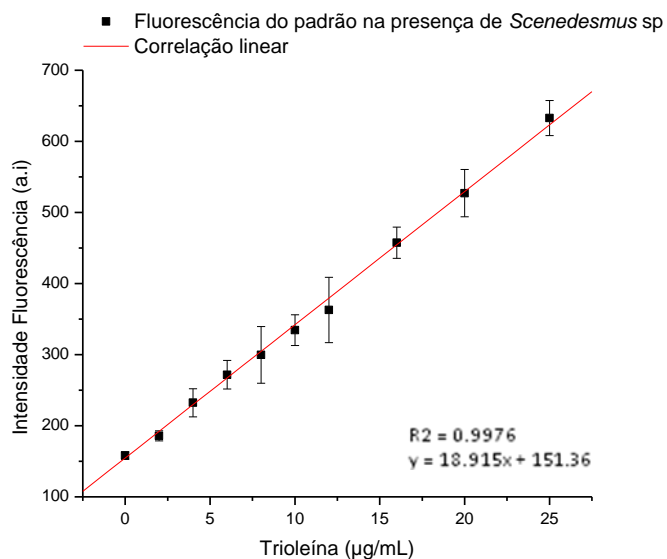
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Solução de trioleína em piridina ( $\mu\text{L}$ )	Água (mL)	Fluorescência (i.u)	Desvio Padrão ( $\pm$ )
0	0	3,000	4,014	1,89
2	6	3,994	68,545	6,02
4	12	2,988	132,556	3,83
6	18	2,982	221,301	0,67
8	24	2,976	295,879	1,56
10	30	2,970	370,448	22,48
12	36	2,964	419,666	23,58
16	48	2,952	612,349	4,20
20	60	2,940	736,668	18,50
25	75	2,925	921,072	45,67



**Figura 14.** Curva analítica obtida através de leitura em espectrofluorímetro, de diluições sucessivas do padrão de trioléina, para quantificação de lipídeos neutros.

Traçada a curva-padrão (Figura 14) através da qual, com posterior regressão linear, obteve-se a seguinte equação:  $y = 37,152x - 4,4181$  e  $R^2 = 0,9984$  para a quantificação de triacilglicerídeos através do método do vermelho do Nilo. Os resultados mostram uma positiva relação linear. Sendo assim, esta curva foi utilizada de modo a quantificar os lipídeos neutros presentes na microalga em estudo.

A correlação entre fluorescência e quantificação de lipídeos neutros (Figura 15) também foi avaliada para uma densidade fixa de  $1,5 \times 10^6$  da microalga *Scenedesmus* sp na presença das diferentes concentrações do padrão, já que a exposição aos mesmos poderia interferir no espectro de absorção, comprometendo a correlação entre os dois parâmetros de contagem.



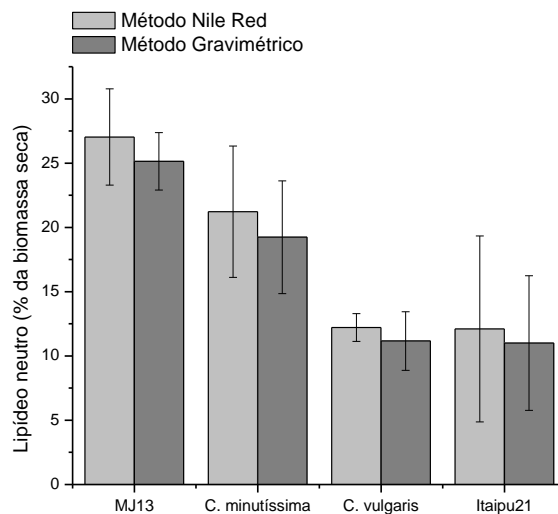
**Figura 15.** Curva analítica obtida através de leitura em espectrofluorímetro, de uma densidade fixa de  $1,5 \times 10^6$  da microalga *Scenedesmus* sp na presença de diferentes concentrações de trioleína.

Na presença das células a correlação se manteve, com um  $R^2$  de 0,9976, indicando que o corante conseguiu ser absorvido tanto pelas células como pela substância padrão, e ainda assim apresentarem uma positiva relação linear.

Foi realizada uma comparação do método de fluorescência do vermelho do Nilo com o método gravimétrico convencional proposto por Bligh Dyer (1959). No intuito de verificar se estes apresentam resultados semelhantes, quatro cepas de algas verdes foram cultivadas por 12 dias para acumular lipídeos neutros, e então estas células foram colhidas e analisadas por ambos os métodos citados.

As medidas do conteúdo de lipídeos neutros obtidas através da fluorescência do vermelho do Nilo para *Scenedesmus* sp clone MJ13, *Chlorella minutíssima*, *Chlorella vulgaris* e *Akistrodesmus* sp clone ITAIPU21, foram, respectivamente, de 27,03%, 21,22%, 12,21% e 12,10%, contra 25,14%, 19,24%, 11,16 e 11% obtidos através do método gravimétrico (Figura 16). Comparando estes valores, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os resultados dos dois métodos.

Há pouca informação disponível sobre a determinação do conteúdo absoluto de lipídeos neutros em algas usando o método gravimétrico convencional, calibrado com um padrão de lipídeos. Nossos resultados indicaram não haver diferença significativa entre os dois métodos baseados em valores médios, ao passo que, foi observado um erro entre os dois métodos no conteúdo lipídico neutro a partir da biomassa algal (Tabela 10).



**Figura 16.** Comparação do teor de lipídios, em 4 cepas de microalgas, determinado pelo método de fluorescência vermelho do Nilo e pelo método gravimétrico proposto por Bligh Dyer (1959). Os comprimentos de onda de excitação e emissão de fluorescência utilizados foram de 530 nm e 575 nm, respectivamente. Os dados foram expressos como médias e desvios-padrão obtidos de determinações em triplicata.

**Tabela 10.** Valores expressos por porcentagem em biomassa seca, obtidos através dos métodos fluorimétrico com vermelho do nilo e gravimétrico por Bligh & Dyer (1959), assim como seus respectivos desvios e erro relativo referente a comparação dos dois métodos.

Microalga	Lipídeos neutros (% em biomassa seca)				
	Método Nile Red	Desvio padrão (±)	Método Bligh & Dyer (1959)	Desvio padrão (±)	Erro Relativo (%)
<i>Scenedesmus</i> sp clone MJ13	27.03	3.745	25.14	2.236	6.99
<i>Chlorella minutíssima</i>	21.22	5.109	19.24	4.387	9.33
<i>Chlorella vulgaris</i>	12.21	1.083	11.16	2.276	8.59
<i>Ankistrodesmus</i> sp ITA21	12.1	7.23	11	5.237	9.09

Uma explicação plausível para os erros observados, deve-se ao fato que o método gravimétrico convencional envolve várias etapas complicadas, como a extração de lipídeos, separação e concentração das fases, o que pode resultar na perda de alguns lipídeos neutros, como observado por outros investigadores (Lee et al., 1998 ; Elsey et al, 2007).

Por outro lado, o método de fluorescência por vermelho do Nilo, pode superestimar ou subestimar o teor de lípidos neutros, dependendo das características individuais das cepas de algas envolvidas, devido especialmente à composição da parede celular, assim como às concentrações de clorofila, membrana, e de vários outros compostos lipofílicos na célula que podem afetar a quantidade da fluorescência.

Em estudos anteriores, o vermelho do Nilo tem sido utilizado com sucesso como um método de detecção de ambos os lipídios, neutros e polares, em algas de várias classes (Cooksey et al, 1987;. Lee et al, 1998; Elsey et al, 2007). No entanto, este método não conseguiu detectar adequadamente conteúdo lipídico neutro em diversas algas verdes, devido a características de sua composição celular como paredes celulares rígidas que impedem o corante de penetrar na célula e, assim, não causando a fluorescência dos lipídeos destas células.

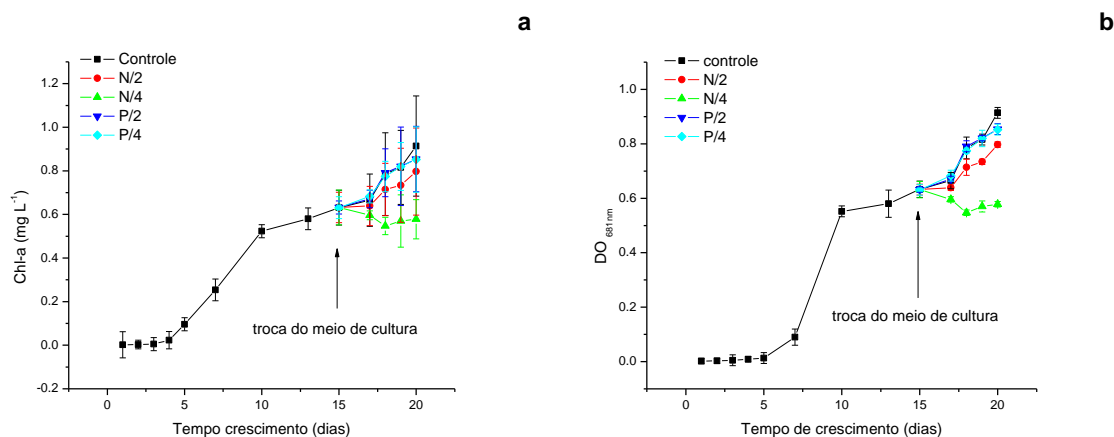
Portanto, mais investigações e refinamentos sobre este método podem ser úteis, como a seleção de comprimentos de onda de excitação e emissão que apresentem intensidade máxima, para uma maior sensibilidade, utilização da fração lipídica de cada espécie de interesse como padrões, quantificação de lipídeos neutros e polares para a calibração de cada espécie em estudo, entre outros. Desta maneira a utilização deste tipo de

metodologia, fornece uma alternativa de análise que requer amostras menores e oferece ganho de tempo considerável em comparação com outras técnicas de quantificação.

#### 4.6 Caracterização da limitação de N e P na microalga *Scenedesmus* MJ13

##### 4.6.1 Impacto no crescimento celular

A Figura 17 mostra as curvas de crescimento da *Scenedesmus* MJ13, obtidas por concentração de clorofila-*a* e densidade celular. Visando o choque nutricional nesta primeira etapa experimental, o meio WC foi repostado por meio fresco, mas com limitações de N e P em sua composição: meio controle sem alteração da concentração de N e P, na formulação do meio WC; e outros meios com a quantidade de N/2; N/4; P/2 e P/4.

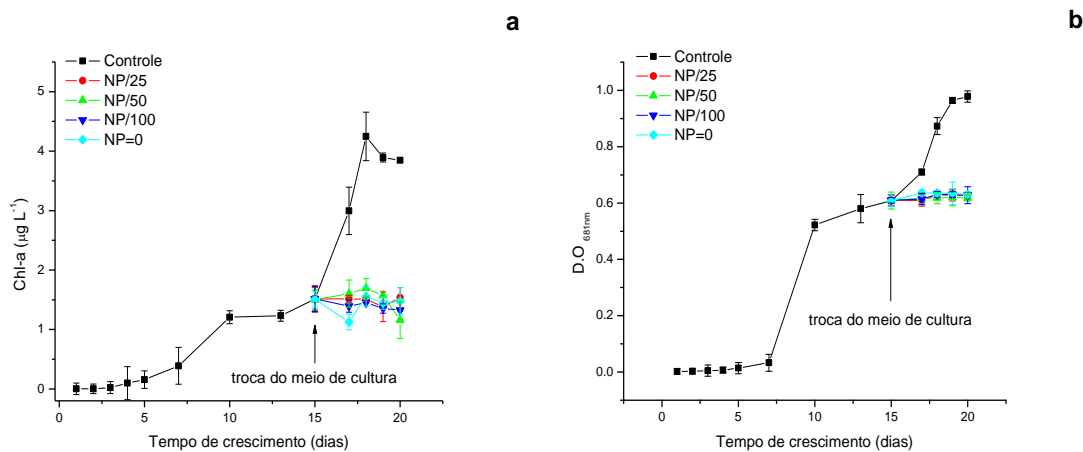


**Figura 17.** Cinética de crescimento celular da microalga *Scenedesmus* MJ13 por incremento de clorofila-*a* (a) e D.O<sub>681nm</sub> (b) em função do tempo de cultivo e de exposição às diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo referente à primeira etapa experimental. A seta indica a idade da cultura quando o meio WC foi trocado pelos meios com diferentes concentrações de N e P.



Analisando estes dados observa-se que após a introdução do meio WC modificado, com concentrações de N e P mesmo em menores concentrações, as células saíram de sua fase estacionária e voltam a realizar citocinese até o fim da amostragem, com exceção da cultura com concentração N/4, que de continuou em fase estacionária.

Na segunda etapa experimental, da mesma forma visando o choque nutricional, o meio WC foi repostado por meio fresco também com certas limitações quanto à concentração de N e P: meio controle sem alteração da concentração de N e P; NP=0; NP/100; NP/50 e NP/25. A Figura 18 ilustra as curvas de crescimento obtidas por concentração de clorofila-*a* e densidade celular.



**Figura 18.** Cinética de crescimento celular da microalga *Scenedesmus* MJ13 por incremento de clorofila-*a* (a) e  $D.O_{681nm}$  (b), em função do tempo de cultivo e de exposição às diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo referente à segunda etapa experimental. A seta indica a idade da cultura quando o meio WC foi trocado pelos meios com diferentes concentrações de N e P.

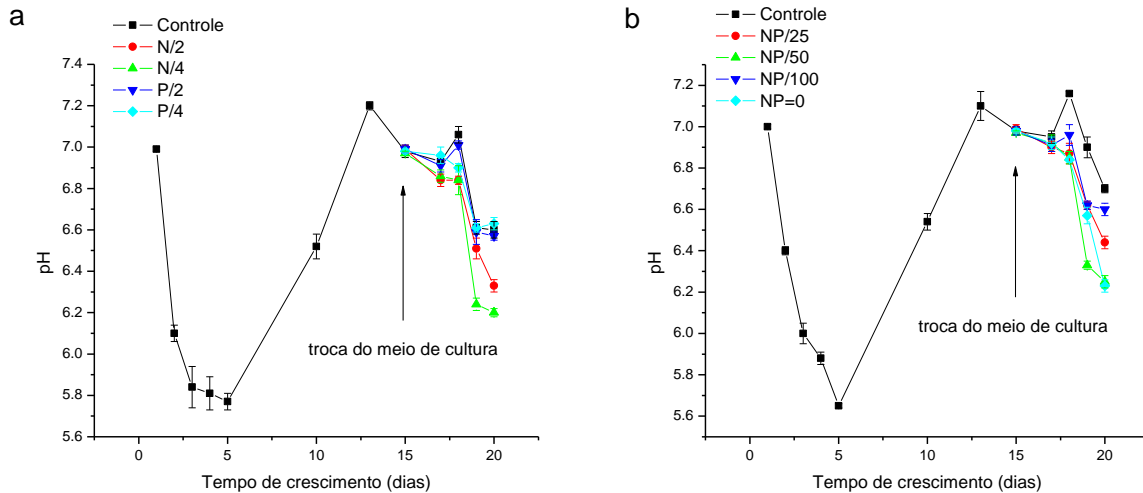
Ao contrário do que ocorre na primeira parte experimental, através da inspeção visual da Figura 18 pode-se verificar que após ocorrer a troca do meio de cultura, somente o meio controle continuou crescendo, enquanto que os demais tratamentos não apresentaram crescimento significativo, permanecendo na fase estacionária de crescimento. É importante ressaltar que além da inserção de nutrientes nas duas etapas experimentais, elas também receberam o emprego de CO<sub>2</sub> em seus cultivos, o qual pode ter contribuído significativamente em relação ao aumento na produtividade das culturas (densidade celular máxima e biomassa obtida) de maneira distintas: como fonte de carbono disponível para as células; por ter acidificado o meio de cultura, aumentando a quantidade de CO<sub>2</sub> disponível no meio em comparação com as demais formas possíveis de serem encontradas na água; por disponibilização de outros nutrientes.

#### *4.6.2 Impacto no pH do meio de cultivo*

Durante o cultivo da microalga não ocorreram correções no pH do meio, mas seus valores foram registrados regularmente durante o seu crescimento e são mostrados na Figura 19. Dentre os fatores mais importantes no cultivo de algas, destaca-se o pH do meio de cultura pois este também determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio, influenciando o metabolismo das algas.

O pH depende de vários fatores como composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade do CO<sub>2</sub>) e atividade metabólica das células. A variação do pH em culturas de

microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólitos produzidos (Grima et al., 1999)



**Figura 19.** Variação dos valores médios de pH do cultivo de *Scenedesmus* MJ13, crescendo em diferentes concentrações de N e P. a) Primeira etapa experimental; b) Segunda etapa experimental. A seta indica a idade da cultura quando o meio WC foi trocado pelos meios com diferentes concentrações.

Nas duas etapas experimentais nota-se uma queda em todos os valores de pH logo após o primeiro dia de cultivo, isto deve-se à injeção de  $\text{CO}_2$  na cultura, o que causou a acidificação do meio de cultivo. Após o 5<sup>o</sup> dia de crescimento, quando a microalga entra em fase Log, e com a redução de nutrientes, produtos da solubilização do  $\text{CO}_2$  e a retirada do  $\text{CO}_2$  pela fotossíntese o pH começa a subir tendendo a um equilíbrio.

Em meio aquoso o carbono inorgânico pode estar na forma de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (ácido carbônico),  $\text{HCO}_3^-$  (bicarbonato) ou  $\text{CO}_3^{2-}$  (carbonato) e suas proporções dependem do pH, sendo que, conforme com o aumento do pH (alcalinização) as proporções bicarbonato e carbonato aumentam no meio de cultura. Assim, numa cultura com pH ácido ocorre uma maior disponibilidade de  $\text{CO}_2$ , sendo esta a fonte de carbono preferida pelas microalgas, uma vez que este composto se difunde rapidamente (adsorção passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de fixação. Já o bicarbonato é incorporado ativamente, gerando um gasto energético para suportar este processo (Raven, 1988).

Quando o meio de cultura é repostado, o pH do meio retorna a valores próximos de 7, mas logo em seguida tende a cair novamente como ocorreu no início dos cultivos, possivelmente pela complexação de subprodutos da cultura com os nutrientes introduzidos através do meio. A exposição de cultivos a altos pHs pode inibir a citocinese das espécies, aumentando a produção de TAG (Guckert & Cocksey 1990). Visto que todos os tratamentos apresentaram um padrão na cinética da curva de pH, portanto esta variável não foi definitiva para diferenciar a produtividade de óleo das microalgas.

#### 4.6.3 Caracterização da microalga *Scenedesmus* sp por espectroscopia de FTIR

A Figura 20 apresenta os espectros em função do tempo de crescimento, com os diferentes tratamentos realizados, em relação à razão N e P, referidos a primeira etapa experimental. Já a Figura 21 apresenta o mesmo padrão de comparação dos espectros, mas

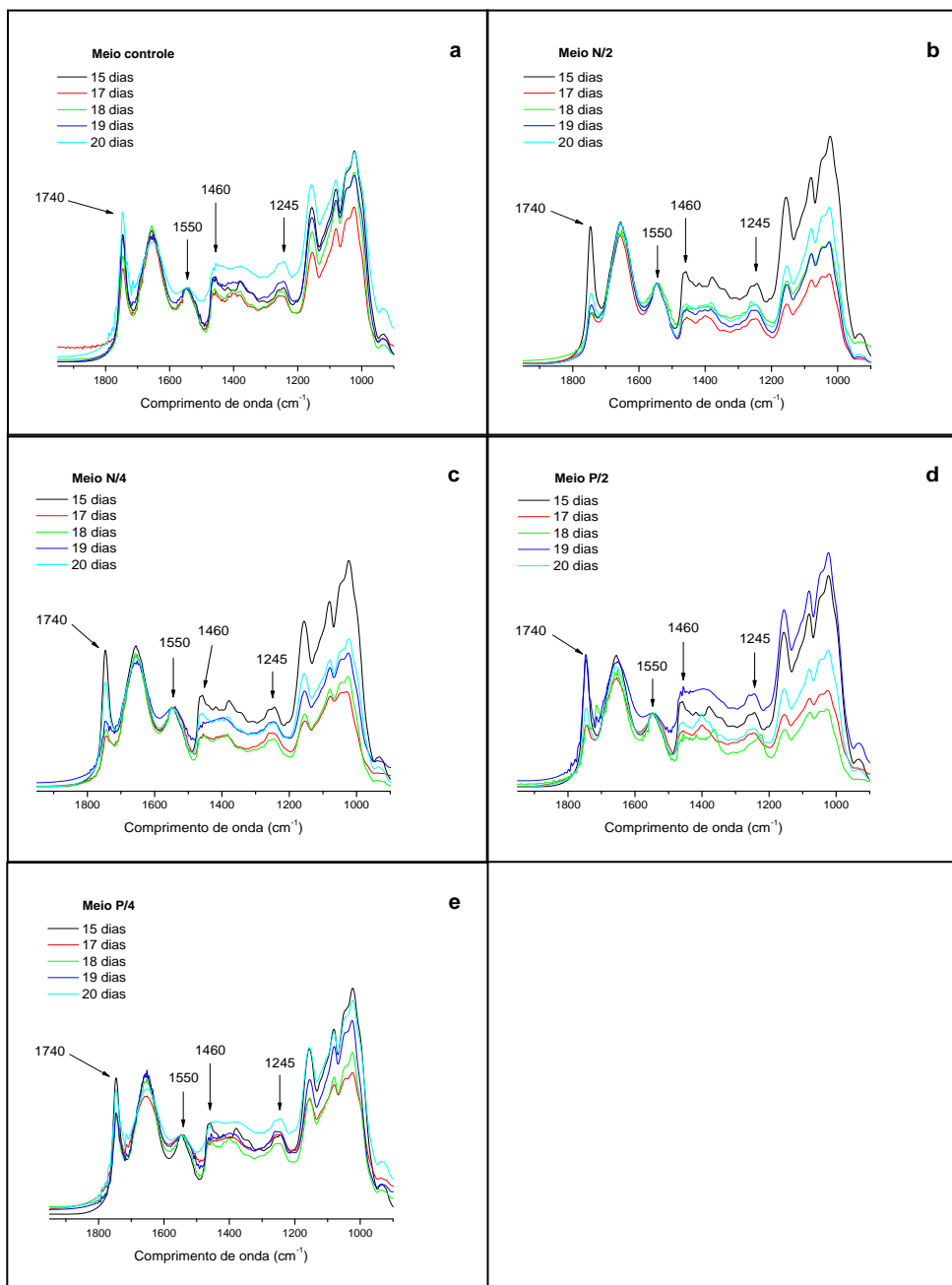
referente à segunda etapa experimental. Bandas relacionadas à produção lipídica (1745, 1460 e 1245  $\text{cm}^{-1}$ ) e a banda referente à biomassa (1550  $\text{cm}^{-1}$ ) estão indicadas nos espectros.

Observa-se que há uma semelhança entre os espectros de ambas as etapas, sem muitas diferenças nos tipos de sinais, mas as intensidades dos mesmos variam bastante em função do tempo e tratamento recebido.

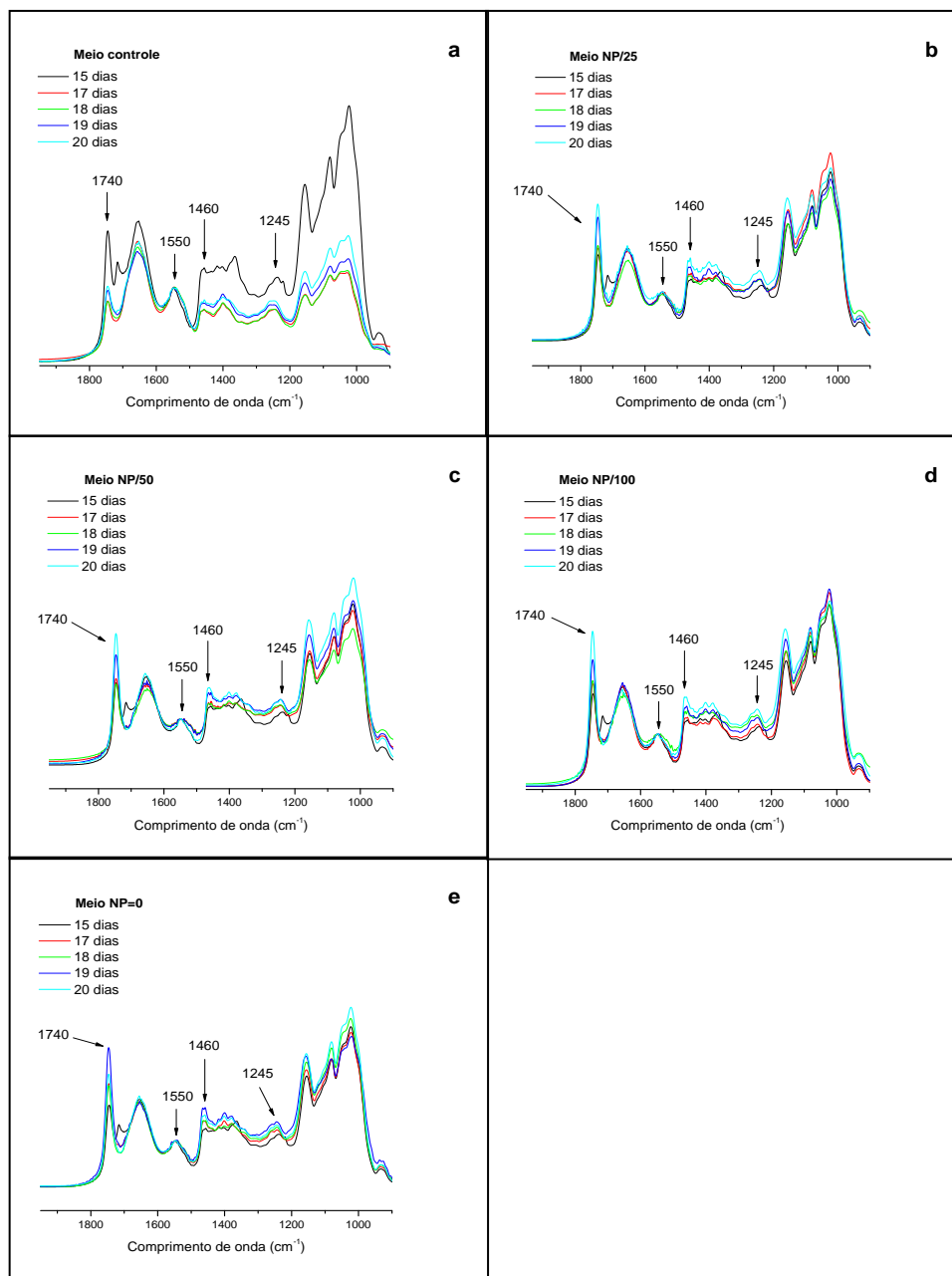
As absorções mais significativas para a caracterização do rendimento lipídico desta microalga foram encontradas na região do infravermelho entre 1900 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , sendo mais representativa a absorção do comprimento de onda em 1745  $\text{cm}^{-1}$  que será discutida adiante.

Em todos os tratamentos, das duas etapas experimentais, podem-se observar absorções na região do infravermelho, entre 1300 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , ou seja, absorção de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de vibração angular de lipídeos e proteínas.

Além disso, ocorre uma fraca absorção em torno de 1380  $\text{cm}^{-1}$  devido a estiramento simétrico de  $\text{COO}^-$  de cadeias laterais de aminoácidos e ácidos graxos livres. Em torno de 1245  $\text{cm}^{-1}$ , têm-se absorções atribuídas ao estiramento de ligação  $\text{P=O}$  de grupos vibracionais de fosfolipídeos ou também de alguns carboidratos.



**Figura 20.** Espectros no infravermelho de *Scenedesmus* MJ13 referentes a primeira etapa experimental. (a) Meio controle composto por WC completo, (b) Meio WC com concentração de N/2, (c) Meio WC com concentração de N/4, (d) Meio WC com concentração de P/2, Meio WC com concentração de P/4. Cada figura apresenta uma análise Comparativa de suas principais absorções, de 1950 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , através da normalização do sinal em 1550  $\text{cm}^{-1}$  referente à produção de biomassa.



**Figura 21.** Espectros no infravermelho de *Scenedesmus* MJ13 referentes a segunda etapa experimental. (a) Meio controle composto por WC completo, (b) Meio WC com concentração de NP/25, (c) Meio WC com concentração de NP/50, (d) Meio WC com concentração de NP/100, Meio WC NP=0, sem nitrogênio e fósforo. Cada figura apresenta uma análise comparativa de suas principais absorções, de 1950 a 900 cm<sup>-1</sup>, através da normalização do sinal em 1550 cm<sup>-1</sup> referente à produção de biomassa.

É possível fazer uma relação entre as bandas de  $2875\text{ cm}^{-1}$  (estiramento simétrico de  $\text{CH}_3$ ) e  $2850\text{ cm}^{-1}$  (estiramento simétrico de  $\text{CH}_2$ ). Como os ácidos graxos têm fórmula  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{C}=\text{OR}$  pode-se considerar um índice de comparação dos comprimentos das cadeias alifáticas de cada amostra, podendo inferir se a cadeia carbônica é maior ou menor.

O estiramento vibracional  $\text{C-H}_x$  pode ser usado na espectroscopia de infravermelho para avaliar o comprimento da cadeia carbonica e o grau de ramificação dos grupos laterais alifáticos dentro da matéria orgânica. Se a razão  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  apresentar valores mais altos, as cadeias alifáticas estão se tornando maiores ou menos ramificadas. O oposto ocorre caso o valor desta mesma razão for menor, as cadeias alifáticas serão mais curtas ou mais ramificadas. A Tabela 11 e a Tabela 12 ilustram a razão das intensidades de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  referente aos sinais em  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2875\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, para cada etapa experimental.

**Tabela 11.** Razão das intensidades dos sinais de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  em função do tempo, referentes a primeira etapa experimental, para cada tipo de tratamento realizado.

Dias de Crescimento	Razão $I_{2850}(\text{CH}_2)/I_{2875}(\text{CH}_3)$				
	Controle	N/2	N/4	P/2	P/4
15	1.79195	1.08734	1.82619	2.19628	2.1945
17	0.75317	1.28205	1.65054	0.85198	0.93282
18	0.79566	1.31354	1.52684	0.8908	0.91879
19	1.15835	1.43519	1.63534	1.06799	1.17482
20	1.13767	1.83831	2.14873	1.40381	1.95556



**Tabela 12.** Razão das intensidades dos sinais de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> em função do tempo, referentes a segunda etapa experimental, para cada tipo de tratamento realizado.

Dias de Crescimento	Razão I <sub>2850</sub> (CH <sub>2</sub> )/I <sub>2875</sub> (CH <sub>3</sub> )				
	Controle	NP/25	NP/50	NP/100	NP=0
15	1.23188	1.24865	1.22987	1.25643	1.23445
17	1.25301	1.31874	1.32636	1.33788	1.31543
18	1.23514	1.34153	1.32401	1.34429	1.30947
19	1.21046	1.37805	1.34467	1.33284	1.39607
20	1.29100	1.32609	1.35777	1.36145	1.32669

Comparando-se as intensidades da razão I<sub>2850</sub> (CH<sub>2</sub>)/I<sub>2875</sub> (CH<sub>3</sub>), apresentadas na Tabela 11, observa-se que praticamente em todos os tratamentos, logo após o primeiro dia de troca do meio de cultura (15º dia) todas as amostras apresentaram uma queda em seus valores desta razão. Ou seja, pode-se dizer que em um primeiro momento devido a adaptações fisiológicas da microalga, a cadeia carbônica desta acaba tornando-se menor e mais ramificada em resposta ao estresse que recebeu.

Ao decorrer do tempo, observa-se uma tendência no aumento da cadeia carbônica e diminuição de sua ramificação. Este efeito é observado a partir do 17º dia de crescimento nos tratamentos N/2 e P/2, nos tratamentos N/4 e P/4 este efeito ocorre a partir do 18º dia e o meio controle apresenta uma tendência no aumento da cadeia carbônica a partir do 17º dia, mas logo no 20º dia esta começa a diminuir de tamanho ou aumentando suas

ramificações. Pode-se inferir que a cadeia carbônica dos ácidos graxos da cultura com tratamento N/4, poderá ser em média maior do que a dos outros tratamentos da primeira etapa experimental.

Ao contrário do que foi observado nos tratamentos realizados na primeira etapa, todas as culturas da segunda etapa experimental (Tabela 12) apresentaram um aumento da sua cadeia carbônica e diminuição dos números de ramificações, efeito este constatado nos valores das razões registrados no 17º dia de cultivo.

As culturas controle, NP/50 e NP/100 mostraram uma tendência do aumento da sua cadeia carbônica ao decorrer do tempo, já as culturas NP/25 e NP=0 apresentaram esta mesma tendência até o 19º dia de cultivo, seguido de uma queda nos valores desta razão quando atingem o 20º dia.

Os resultados confirmam que as condições de cultivo podem alterar não somente a quantidade de óleo produzido, mas também a qualidade uma vez que em microalgas grande parte da biossíntese dessas moléculas está associada a respostas às condições ambientais, principalmente àquelas envolvidas com estresse que alterem a citocinese do organismo (Spoehr & Milner, 1949; Sato et al., 2000; Hu, 2004).

Este tipo de ensaio torna-se interessante quando se faz necessário uma estimativa do grau de saturação das cadeias carbônicas, relacionadas ao estudo da produção lipídica de microalgas. Através destes índices pode-se obter, então, um método de comparação das respostas fisiológicas apresentadas pela microalga na biossíntese de lipídeos em cada tipo de tratamento realizado. Óleos com alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados são

indesejáveis para uso como combustível, devido à sua baixa estabilidade química, quando comparados com ácidos graxos monoinsaturados ou saturados. Assim, não existe somente uma busca por organismos com alta produtividade e alta qualidade de óleo, mas também por novas metodologias que nos auxiliem na prospecção destes organismos.

Lin e Ritz (1993) demonstraram através do FTIR na proporção  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , analisando suas intensidades, o efeito da mudança do comprimento da cadeia carbônica usando uma série de conhecidos n-alcenos (hidrocarbonetos saturados de cadeia longa). Eles encontraram uma correlação de número de carbono de n-alcenos em comparação com os valores correspondentes da razão  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ . Segundo o mesmo autor através da análise de FTIR de *Tanarium conoideum*, um valor  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  de 11 corresponderia a um comprimento de cadeia n-alcenos de 24 carbonos. Para *Leiosphaeridia* sp. e *Satka squamifera* valores de 2,4  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  corresponderia a um comprimento de cadeia n-alcenos de 12 carbonos, enquanto uma proporção  $\text{CH}_2/\text{CH}_3 < 2$  corresponde a um comprimento de cadeia n-alceno de oito carbonos. É importante ressaltar, no entanto, que estas estimativas de tamanho médio da cadeia são baseadas em um modelo extremamente simplificado n-alcenos. Compostos por exemplo como alquil benzenos, ácidos graxos de cadeia longa, e alquil-cicloalcenos não são considerados, por isso a necessidade de uma correlação com compostos de estruturas mais complexas. Portanto no presente trabalho os valores obtidos da razão das intensidades dos sinais de  $\text{CH}_2$  ( $I_{2850}$ ) e  $\text{CH}_3$  ( $I_{12875}$ ) são meramente comparativos entre as amostras analisadas, sem o objetivo de quantificar o tamanho da cadeia carbônica, mostrando um tipo de resposta fisiológica da microalga ao longo do tempo em cada tratamento realizado.

#### 4.6.4 Caracterização do sinal em $1745\text{ cm}^{-1}$

Para um melhor entendimento dos espectros de FTIR de células microbiais, há necessidade de uma percepção geral de sua composição, tipo de célula, estruturas químicas presente e conhecimento da diferenciação de células e tecidos. No nível mais simples, todos os sistemas biológicos são compostos de água, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e pequenas moléculas.

Dentro deste contexto, para uma melhor compreensão da caracterização do sinal em  $1745\text{ cm}^{-1}$ , região esta referente ao estiramento vibracional do grupo C=O de éster de lipídeos, deve-se ter em mente a estrutura do composto químico denominado triacilglicerídeo (Figura 22). Este estiramento de ligação citado irá absorver a radiação eletromagnética na região do infravermelho, no comprimento de onda de  $1745\text{ cm}^{-1}$  e, como consequência, os átomos envolvidos entrarão em vibração, onde dependendo da quantidade deste composto em sua amostra, resultará em uma maior ou menor absorbância em seu espectro.

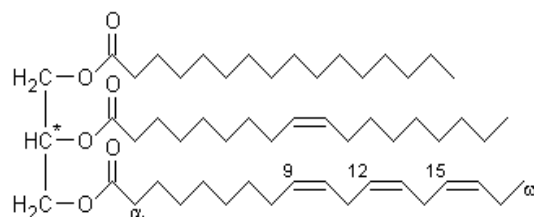
Portanto, por esta região indicar a absorção de energia de um estiramento de ligação característico de triacilglicerídeos, acaba-se tornando vantajosa a análise de produção de TAGs por esta banda, fora a vantagem de se tratar de uma forma de análise rápida e sem a necessidade de tratamento prévio e/ou purificação dos componentes químicos presentes nestas células.

Na Figura 23 tem-se os espectros normalizados, na região espectral entre  $1900$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , da *Scenedesmus* sp em diferentes dias de crescimento, após ser submetida a diferentes concentrações de N e P, ensaio referente a primeira parte experimental. O meio

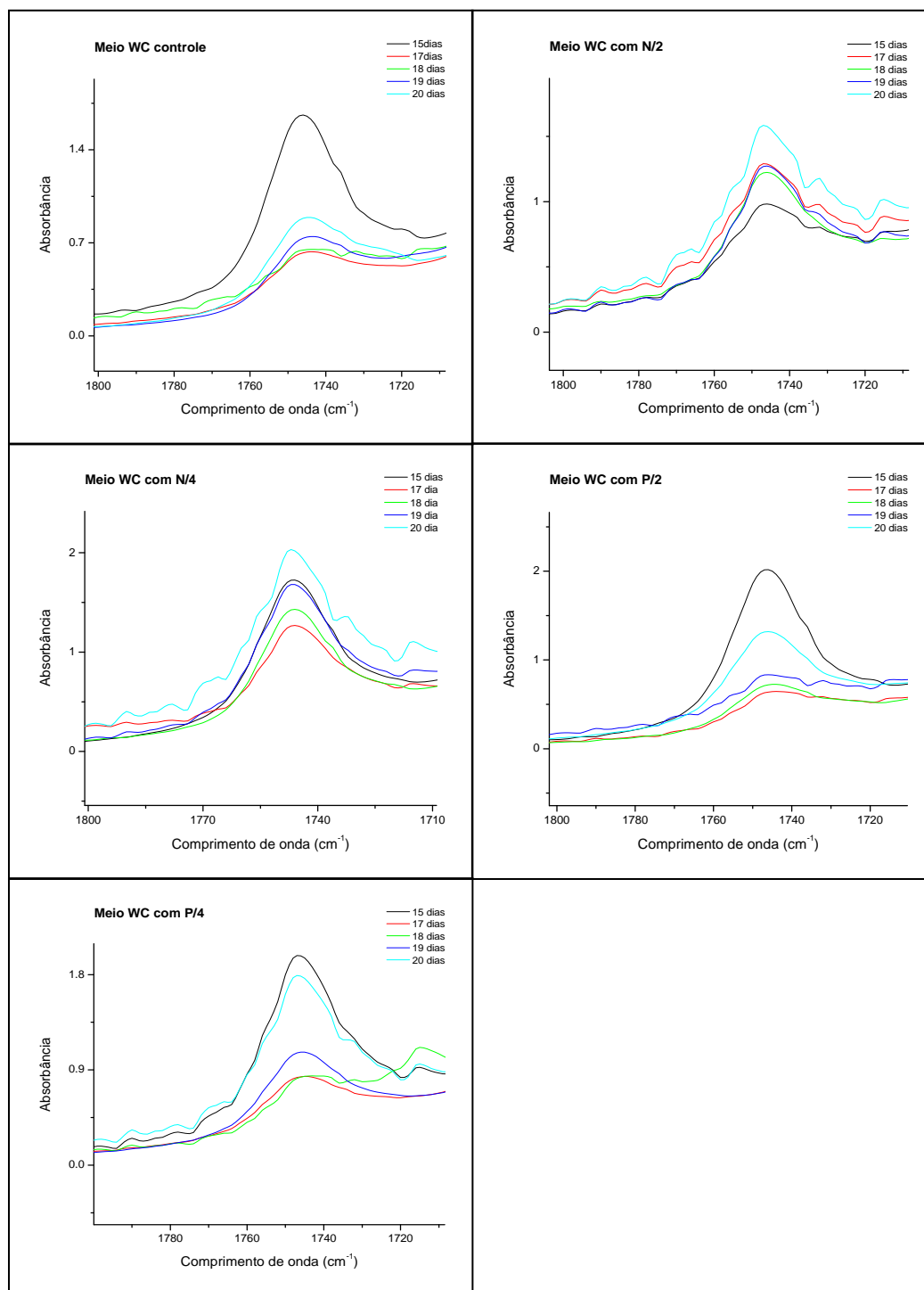
controle é considerado como o branco, pois as concentrações de N e P do meio WC não foram alteradas. Nos espectros das Figuras 23 e 24 pode-se observar que todos os tratamentos apresentam forte absorção na banda da região de  $1745\text{ cm}^{-1}$ , indicando assim a presença dos grupos éster (C=O) de triacilglicerídeos.

Observa-se uma alta intensidade na absorbância da microalga com 15 dias de crescimento, após isto este sinal decai e volta a subir lentamente ao decorrer do tempo, isso se deve ao fato das células ao receberem mais nutrientes, saíram da fase estacionária em que se encontravam, e entraram novamente em divisão celular. Este efeito também pode ser observado nos tratamentos P/2 e P/4, estes receberam um tratamento onde o meio de cultura apresentava certa privação de fósforo em sua composição.

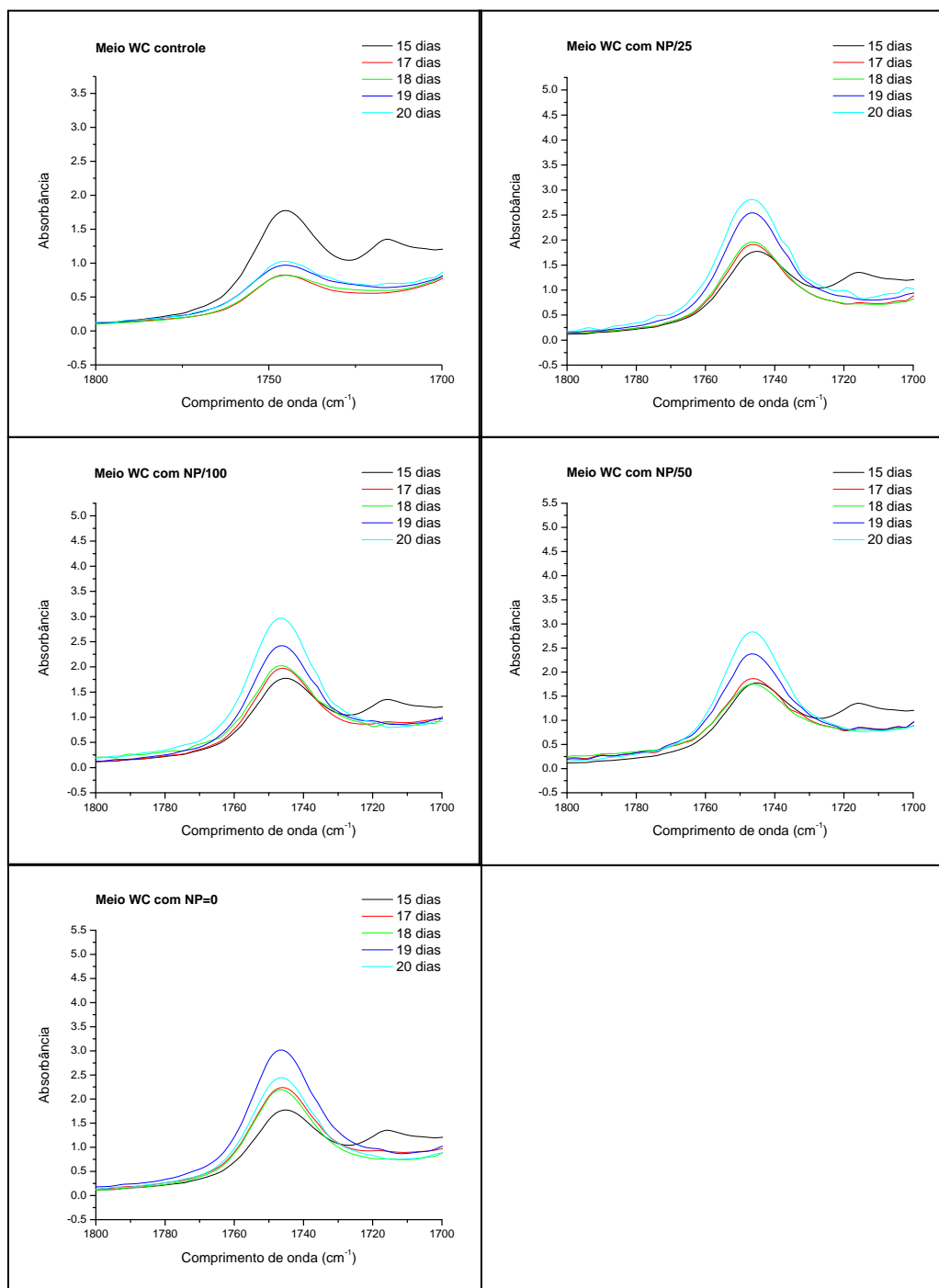
O fósforo é tão importante que pequenas quantidades no meio de cultura podem limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas. Assim, a quantidade de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  influencia não somente na produção de ATP, mas atua também como precursor no crescimento celular (Mahasneh, 1997). Em contra partida, a carência de fosfato no meio produz aumento no teor de lipídeos na composição da biomassa seca.



**Figura 22.** Estrutura química de um triacilglicerol insaturado com radicais carboxílicos diferentes. À esquerda da molécula: glicerol. A direita da molécula, de cima para baixo: ácido palmítico, ácido oléico, ácido alfa-linolênico.



**Figura 23.** Espectros normalizados da *Scenedesmus MJ13*, referentes a primeira etapa experimental, em diferentes dias de crescimento e sob a condição de diferentes concentrações de N e P, mostrando os sinais de absorção na região de 1745cm<sup>-1</sup> em cada tratamento realizado.



**Figura 24.** Espectros normalizados da *Scenedesmus* MJ13, referentes a segunda etapa experimental, em diferentes dias de crescimento e sob a condição de diferentes concentrações de N e P, mostrando os sinais de absorção na região de  $1745\text{cm}^{-1}$  em cada tratamento realizado.

Este efeito do aumento no teor de lipídeos pode ser observado a partir do 20º dia de crescimento da microalga no tratamento P/2 e a partir do 19º dia no tratamento P/4, onde suas absorções em  $1745\text{ cm}^{-1}$  apresentam um aumento considerável na intensidade deste sinal. A depleção do fósforo é outro dos fatores nutricionais que mais causam aumento da síntese de óleo em determinadas espécies (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006). Entretanto, a limitação do fósforo pode também causar o decréscimo na síntese de óleo (Reitan et al. 1994). Por outro lado, a limitação por fósforo pode também causar mudanças na qualidade dos TAG sintetizados em diversas espécies (Reitan et al. 1994).

Já os espectros dos meios WC com N/2 e N/4, apresentam uma resposta um pouco diferente dos outros. Estas culturas receberam, mesmo que atenuadas, uma privação de N, na composição do meio WC repostos. A redução na quantidade deste nutriente no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente (Rigano et al., 1998).

Conforme experimento realizado por Shifrin e Chisholm (1981), o teor lipídico de diversas espécies de microalgas aumentou de duas a três vezes após quatro e nove dias na ausência de nitrogênio. Este efeito do aumento no teor lipídico pode ser observado nos espectros dos tratamentos N/2 e N/4, onde no primeiro a alga já começou sintetizar lipídeos logo após o choque nutricional e no segundo inicialmente existe uma queda na intensidade do sinal, mas no 19º dia de crescimento atinge o maior valor de absorbância quando comparado com todos os outros tratamentos desta primeira etapa experimental.



Já na segunda etapa experimental, ao contrário do que se é observado nos espectros da Figura 24, quando ocorre a troca do meio de cultura, não é vista a diminuição do sinal em  $1745\text{ cm}^{-1}$ , e sim o aumento da absorbância desta banda no decorrer do tempo de cultivo. Com a troca do meio, mais nutrientes foram inseridos, mas aqueles essenciais para a construção celular, como o N e P, são repostos em quantidades mínimas, prejudicando assim a realização da citocinese do organismo, com exceção para o meio controle. Neste a alga dispendo de recursos nutricionais suficientes, entra em fase logarítmica novamente, utilizando também de suas reservas lipídicas como fonte de energia para a divisão celular.

O efeito do aumento (Tabela 13) no teor de lipídeos, ao decorrer do tempo, pode ser observado em todos os tratamentos com a privação dos nutrientes N e P. Quando comparados todos os tratamentos tanto da primeira etapa experimental, quanto da segunda etapa, o maior valor de absorbância é registrado no 19º dia de cultivo para o meio de cultura sem N e P em sua formulação.

A literatura cita que em certas espécies de clorófitas (algas verdes) a produção de TAG em respostas a fatores de estresse pode duplicar ou triplicar, chegando a 46% do peso seco celular (Hu et al., 2008). As microalgas expostas a fatores de estresse nutricional e, principalmente, de luz, sintetizam triacilglicerídeos e/ou carboidratos como “poço de elétrons”. O excesso de elétrons que se acumula na cadeia de transporte durante a fotossíntese, que continua, pode induzir a produção, em excesso, de espécies oxo-reativas o que frequentemente pode causar eventos de fotoinibição, danos às membranas e macromoléculas e mesma a fotooxidação. A formação de ácido graxo C18, por exemplo, consome cerca de 24 NADPH derivado da cadeia de transporte de elétrons, enquanto para a

produção de polissacarídeos com massa equivalente, sintetizado principalmente em estresse de limitação de nitrogênio (Vieira & Myklesstad, 1986) e fósforo, o consumo de NADPH é cerca da metade.

De um modo geral, esse comportamento é uma resposta à depleção de nitrogênio e fósforo: não dispondo de nitrogênio para a estruturação necessária para a citocinese nem fósforo para o armazenamento/utilização de energia (ATP) a fixação de CO<sub>2</sub> (ou a realocação de estoques internos de carbono) é desviada para carboidratos ou lipídeos. De fato, nas microalgas a síntese de TAG sob estresse não é estrutural, mas para reserva.

Outro fator importante a ser discutido, é a suplementação do tiosulfato nos meios de cultura de “starvation”. Mandal & Mallick (2009), com suplementação de 0,6g L<sup>-1</sup> de tiosulfato de sódio, obtiveram um aumento no teor de lipídeos, da microalga *Scenedesmus obliquus*, de 30,6% em relação ao meio sem tiosulfato.

A possível razão, para a contribuição do tiosulfato no aumento do teor lipídico da microalga, pode ser que, um ambiente redutor leva a um aumento de tamanho do pool de NADH. Nessa condição, a acetil-CoA não entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Desta forma altas concentrações de NADH inibem a enzima citrato sintase, uma das enzimas-chave do ciclo do TCA, levando a um aumento do pool de acetil-CoA. Estas condições proporcionam a converção da acetil-CoA em malonil-CoA, catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACCase), sendo portanto doadora de carbono para a síntese de ácidos graxos. Assim, além da limitação de nitrogênio e fósforo, a suplementação de

tiosulfato no meio de cultura, proporcionou uma melhoria significativa no acúmulo de lipídeos da microalga *Scenedesmus* MJ13.

#### **4.7 Comparação da técnica de FTIR com o método de Bligh-Dyer (1959)**

Neste trabalho optou-se pelo método proposto por Bligh-Dyer (1959), para extração dos lipídeos, que é uma versão simplificada do procedimento clássico usando clorofórmio e metanol proposto por Folch et al. (1957) sendo amplamente citado (Tonial et al., 2009; Brum et al., 2009; Gouveia & Oliveira, 2009) para a comparação deste método gravimétrico com os resultados obtidos através da espectroscopia de FTIR.

Os lipídeos são um dos principais componentes das microalgas e desempenha um importante papel nutricional como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais (Morais, 2006). A composição bioquímica está intimamente ligada à qualidade nutritiva das microalgas, sendo os lipídeos componentes de fundamental importância (Renaud et al., 2002).

Foi verificado que a extração dos lipídios totais pelo método de Bligh e Dyer (1959) não se mostrou eficiente para este tipo de material, devido à dificuldade de rompimento das paredes celulares destes organismos, e também ao fato de ocorrer formação de emulsão, o que dificultou o processo de recuperação dos lipídios. Outro ponto negativo deste método gravimétrico, é que a extração com clorofórmio e metanol extrai todas as substâncias polares da amostra, inferindo maior erro ao método.

A Tabela 13 apresenta uma comparação da razão entre as intensidades das bandas em  $1745/1550\text{ cm}^{-1}$  e  $2930/1550\text{ cm}^{-1}$ , para qualificação do rendimento de óleo nas amostras. A fim de se obter um padrão interno da biomassa foi usado o sinal em  $1550\text{ cm}^{-1}$ , relativo ao teor de proteínas na amostra (Osiro et al., 2004).

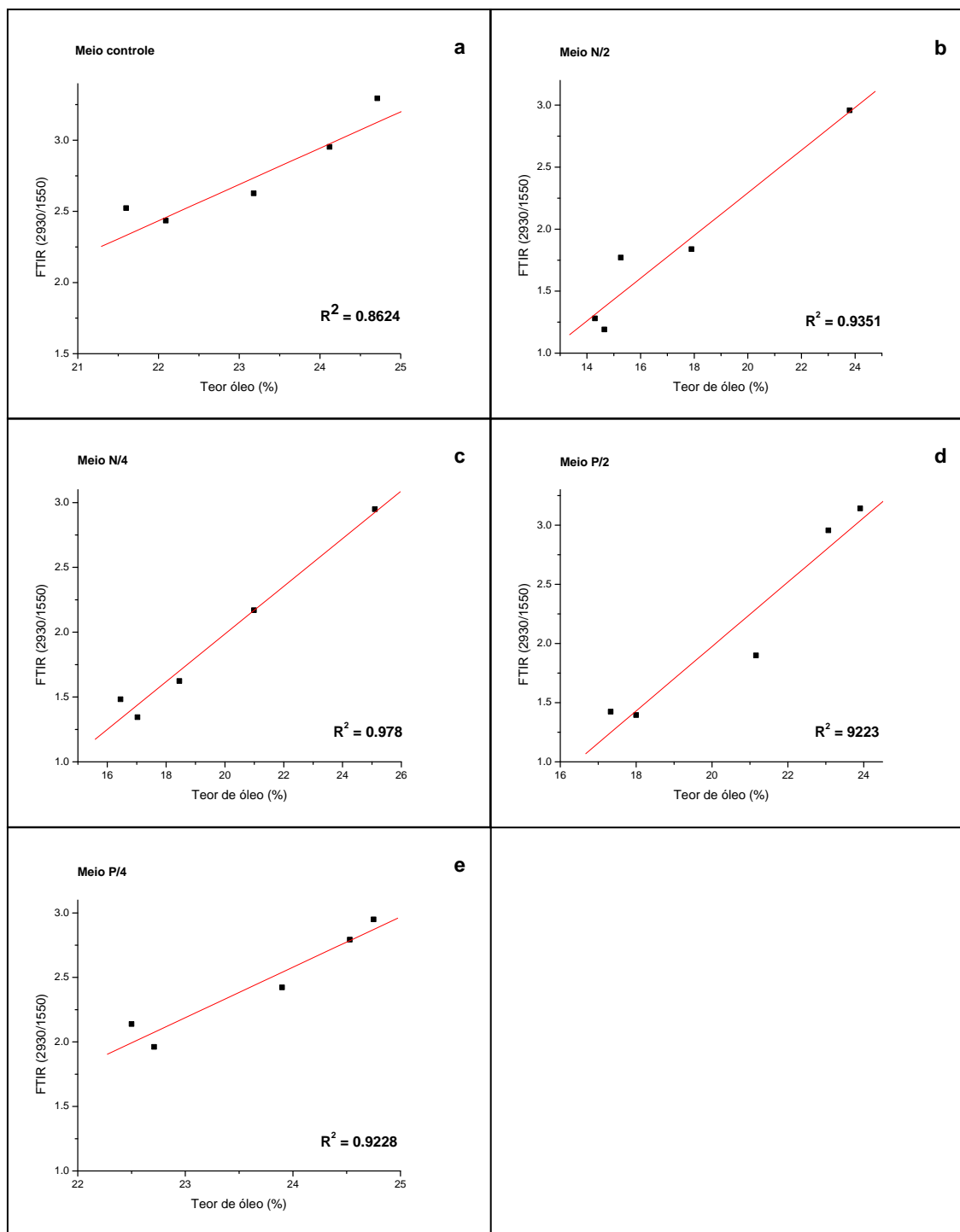
Observa-se que todos os tratamentos realizados na primeira parte experimental, apesar de terem estimulados a produção de TAG nas microalgas, o maior valor para a razão  $1745/1550\text{ cm}^{-1}$  referente ao 19º dia de cultivo, foi de  $1.313 \pm 0.01$ , do meio com tratamento N/4. Quando comparados os valores desta mesma razão na segunda etapa experimental o 19º dia de cultivo em meio WC sem N e P em sua formulação, apresentou o maior valor ( $2.984 \pm 0.01$ ).

**Tabela 13.** Média das razões entre as intensidades das bandas em  $1745/1550\text{ cm}^{-1}$  e  $2930/1550\text{ cm}^{-1} \pm$  o desvio padrão, calculadas a partir dos espectros de FTIR (análises feitas em duplicatas), teor de óleo estimado a partir do método gravimétrico proposto por Bligh-Dyer (1959) e correlação linear entre o teor de óleo obtido e a razão das bandas  $2930/1550\text{ cm}^{-1}$ .

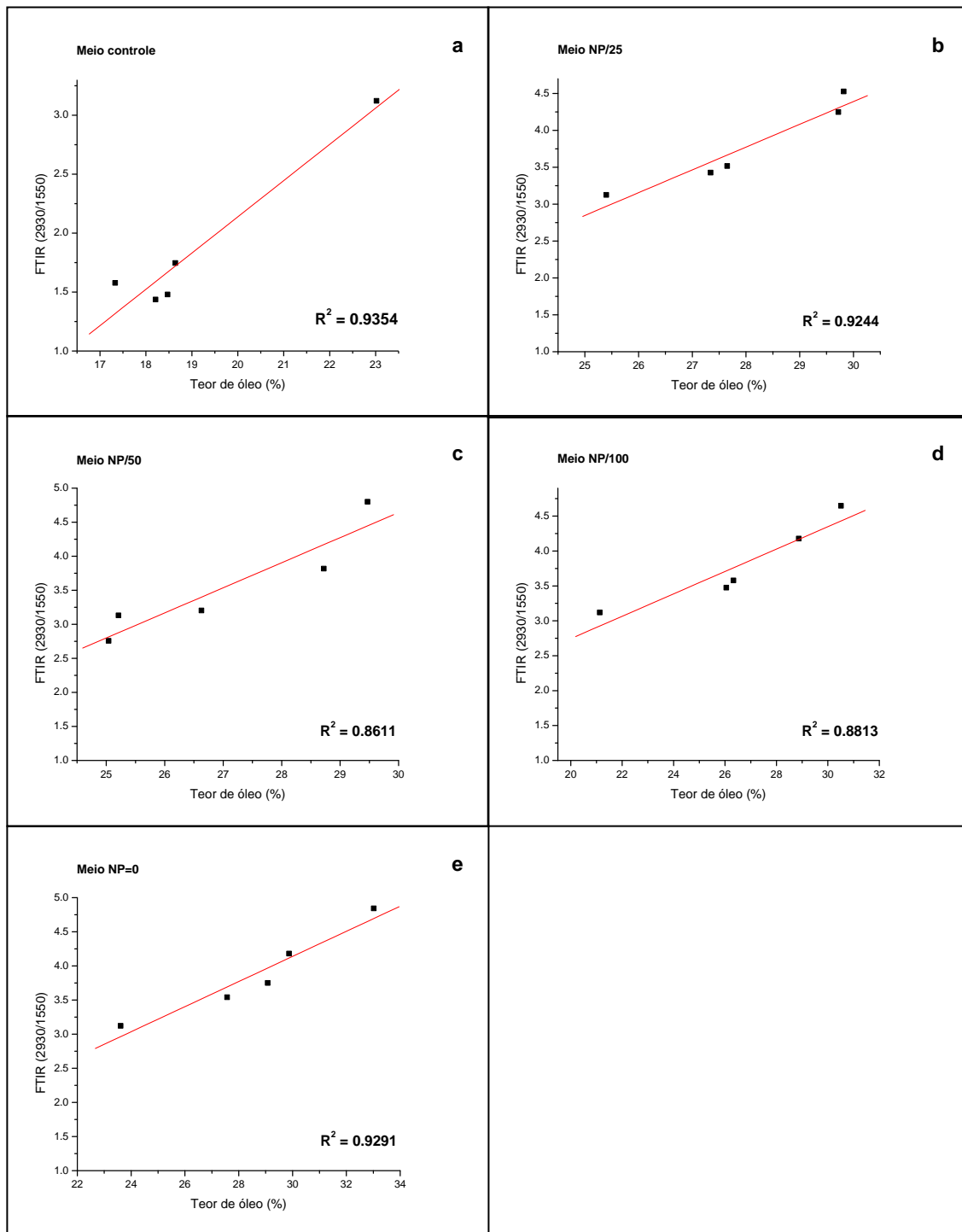
Tratamento	Tempo de cultivo (dias)	1745/1550	Desvio Padrão ( $\pm$ )	2930/1550	Desvio Padrão ( $\pm$ )	% óleo
Controle (1ª Etapa)	15	0.712	0.01	2.953	0.02	24.12
	17	0.261	0.01	2.523	0.00	21.60
	18	0.423	0.00	2.626	0.01	23.18
	19	0.663	0.02	2.435	0.02	22.09
	20	0.988	0.01	3.294	0.01	24.71
N/2 (1ª Etapa)	15	0.714	0.02	2.959	0.01	23.80
	17	0.630	0.01	1.191	0.01	14.65
	18	0.645	0.01	1.280	0.02	14.30
	19	0.737	0.01	1.771	0.01	15.26
	20	0.886	0.01	1.839	0.00	17.90
N/4 (1ª Etapa)	15	0.710	0.00	2.949	0.01	25.10
	17	0.643	0.03	1.344	0.02	17.03
	18	0.725	0.00	1.482	0.01	16.45

	19	1.313	0.01	1.623	0.01	18.45
	20	0.830	0.01	2.169	0.02	20.99
P/2 (1ª Etapa)	15	0.716	0.02	2.955	0.01	23.07
	17	0.838	0.01	1.395	0.02	18.00
	18	0.839	0.00	1.424	0.01	17.33
	19	0.764	0.02	3.141	0.02	23.91
	20	1.067	0.03	1.899	0.03	21.16
P/4 (1ª Etapa)	15	0.712	0.02	2.950	0.01	24.75
	17	1.277	0.00	1.961	0.01	22.71
	18	1.218	0.01	2.139	0.02	22.50
	19	1.236	0.02	2.422	0.01	23.90
	20	1.256	0.01	2.792	0.01	24.53
Controle (2ª Etapa)	15	1.774	0.03	3.121	0.02	23.02
	17	0.825	0.01	1.479	0.00	18.47
	18	0.819	0.01	1.436	0.01	18.21
	19	0.969	0.02	1.577	0.02	17.33
	20	1.02	0.01	1.746	0.01	18.64
NP/25 (2ª Etapa)	15	1.752	0.02	3.124	0.01	25.40
	17	1.896	0.01	3.517	0.02	27.65
	18	2.037	0.03	3.428	0.01	27.34
	19	2.516	0.01	4.248	0.02	29.72
	20	2.777	0.02	4.528	0.00	29.82
NP/50 (2ª Etapa)	15	1.776	0.01	3.130	0.02	25.21
	17	1.851	0.00	3.202	0.01	26.63
	18	1.737	0.01	2.757	0.03	25.04
	19	2.352	0.03	3.818	0.01	28.72
	20	2.801	0.01	4.800	0.01	29.47
NP/100 (2ª Etapa)	15	1.735	0.01	3.119	0.01	21.13
	17	1.963	0.03	3.577	0.02	26.33
	18	2.005	0.01	3.475	0.01	26.05
	19	2.401	0.02	4.178	0.02	28.87
	20	2.931	0.02	4.648	0.02	30.51
NP=0 (2ª Etapa)	15	1.764	0.00	3.122	0.01	23.61
	17	2.229	0.01	3.751	0.01	29.08
	18	2.165	0.01	3.540	0.03	27.57
	19	2.984	0.01	4.842	0.01	33.02
	20	2.418	0.03	4.181	0.01	29.87

Devido ao fato da extração por Bligh & Dyer (1959) representar os lipídeos totais presentes na amostra, e a banda espectral em  $2930\text{ cm}^{-1}$  ser referente ao estiramento de ligação C-H (assimétrico) de  $\text{CH}_2$  presente na estrutura molecular de lipídeos, a partir destes resultados foram feitas correlações lineares entre os teores de óleo obtidos a partir do método gravimétrico, e a razão das intensidades dos sinais de FTIR em  $2930/1550\text{ cm}^{-1}$ , referente à primeira etapa experimental (Figura 25) e segunda etapa experimental (Figura 26).



**Figura 25.** Correlações dos teores de óleo estimados a partir do método gravimétrico proposto por Bligh & Dyer (1959) e a razão das intensidades dos sinais de FTIR em  $2930/1550\text{ cm}^{-1}$ , referentes a primeira etapa experimental.



**Figura 26.** Correlações dos teores de óleo estimados a partir do método gravimétrico proposto por Bligh & Dyer (1959) e a razão das intensidades dos sinais de FTIR em  $2930/1550\text{ cm}^{-1}$ , referentes à segunda etapa experimental.

Com esta análise foi possível observar que a banda espectral de  $2930\text{ cm}^{-1}$  é uma região que também diferencia a produção de lipídeos da microalga nos diferentes tratamentos. Pode-se visualizar uma boa correlação com os resultados obtidos através da espectroscopia de FTIR e o método gravimétrico, indicando assim o potencial do uso desta ferramenta na identificação de algas com potencial para uso como matéria prima na obtenção de biodiesel.

Em virtude disso, a técnica de FTIR mostrou-se muito versátil, pois em um processo de prospecção de um grande número de algas, esta é mais prática, necessita de pequena quantidade de amostra e possui maior rapidez em obtenção dos resultados, ao contrário de métodos gravimétricos como o Bligh-Dyer (1959), cromatografias e espectroscopias de massa como o RMN que exigem uma grande quantidade de amostra e dependem de maior tempo de análise.

Os resultados apresentados são bastante significativos, mostrando que os valores de correlação linear variam de 86,11% para o meio com tratamento NP/50, e atingindo um valor máximo de 97,8%, para o meio com tratamento P/4. É importante destacar que apesar da boa concordância dos resultados, faz-se necessário a construção de uma calibração da técnica espectroscópica de FTIR com alguma solução padrão de lipídeo, ou para maior relevância com o próprio extrato lipídico da microalga, caso a intenção seja estimar a produção de lipídeos totais através da FTIR.



## 5 CONCLUSÃO

Tendo em vista a necessidade urgente de conhecimento sobre novas espécies com potencial de produção de biodiesel, este trabalho propôs algumas metodologias específicas rápidas na sua aplicação, que requerem um mínimo de biomassa e, portanto, úteis para a prospecção de um grande número de espécies em um programa de seleção de microalgas produtoras de óleo.

A análise gravimétrica de lipídeos requer o uso de uma separação de duas fases de solventes que utiliza uma quantidade considerável de material biológico, solvente orgânico e uma série de manipulações que precedem a quantificação. Em um processo de prospecção de grande número de espécies, isso se torna inviável. A utilização da fluorescência do vermelho do Nilo, mostrou-se como um método rápido e confiável na quantificação *in vivo* de lipídeos neutros da microalga, o que poderia servir para uma pré-seleção amostrando-se uma pequena alíquota dos cultivos antes de qualquer outro procedimento.

O FTIR mostrou-se como uma técnica muito vantajosa para a análise de lipídeos em microalgas devido à praticidade, pequena quantidade de amostra e também por não necessitar de extração ou tratamentos químicos. Outra vantagem deste método é a possibilidade de se obter através desta técnica a variação da composição química das células em função do tempo de cultivo.

Foi possível a caracterização da produção lipídica da *Scenedesmus* MJ13 através das bandas espectrais de  $2930\text{ cm}^{-1}$ ,  $1745\text{ cm}^{-1}$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Uma aplicabilidade promissora

da espectroscopia de FTIR seria a sua utilização na análise comparativa, das características bioquímicas, de um grande número de espécies de algas, como por exemplo, em um processo de prospecção. Outro ponto interessante foram os bons valores de correlação linear quando comparados os resultados do FTIR com os obtidos através do método gravimétrico proposto por Bligh & Dyer (1959), indicando uma perspectiva para utilização desta técnica como método de quantificação de lipídeos totais, através da banda espectral situada em  $2930\text{ cm}^{-1}$ .

A utilização de *Scenedesmus* MJ13 como espécie modelo, além das características já citadas, justifica-se por sua proximidade taxonômica com outras espécies já citadas na literatura, como propícias à produção de biodiesel. Também, como modelo mostrou-se útil na utilização comparativa das metodologias testadas. Além disso *Scenedesmus* MJ13 comportou-se, como o esperado e já citado na literatura, com relação às respostas aos fatores de stress: sintetizou triacilglicerídeos e/ou carboidratos como forma de reserva de carbono, mostrando que esta microalga apresenta boa flexibilidade adaptativa a mudanças repentinas nas condições de crescimento celular, ponto positivo para espécies que podem ser organismos chave para a produção de biodiesel.

## REFERÊNCIAS

- Alonso, D.L., Belarbi, E.H., Fernandez-Sevilha, J.M. Rodriguez-Ruiz, J. e Grima, E.M. 2000. **Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum***. *Phytochemistry* 54: 461-471.
- Basova, M.M. 2005. **Fatty acid composition of lipids in microalgae**. *Int. J. Algae*. 7: 33-57.
- Beckmann, N. 1995. **Carbon-13 NMR spectroscopy of biological systems**. San Diego: Academic Press.
- Bligh, E. G., e Dyer, W. J. A. 1959. **Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification**, *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, 37, pp. 911–917.
- Borowitzka, M. 1988. **Fats, oils and hydrocarbons**. Em: Borowitzka, M.A. e Borowitzka, L.J. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, pp 257-287.
- Brum, A. A. S.; Arruda, L. F.; Arce, M. A. B. R. 2009. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal**. *Química Nova*, pp. 849-854.
- Chen, W., Zhang, C.W., Song, L.R., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2009. **A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae**. *J. Microbiol. Meth.* 77, pp. 41–47.
- Colnago, L. A. 1996. **Análise do teor de óleo em sementes por RMN**. São Carlos, SP: Embrapa – Cnpdia, (Circular Técnica).
- Colnago, L.A., Engelsberg, M., Souza, A.A. & Barbosa, L.L. 2007. **High-throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR**. *Anal. Chem.* 79, pp. 1271-1274.
- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Callis, P.R. 1987. **Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red**. *J. Microbiol. Methods* 6, pp. 333–345.

Costa J. A., Radmann e. M., Cerqueira V. S., Santos G. C., Calheiros M.N. 2006. **Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições.** Alim. Nutr., Araraquara. Ed.4, pp.429-436.

Elsey, D., Jameson, D., Raleigh, B., Cooney, M.J., 2007. **Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids.** Journal of Microbiological Methods 68, pp. 639–642.

Eltgroth, M.L., Watwood, R.L., Wolfe, G.V., 2005. **Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*.** Journal of Phycology 41, pp. 1000–1009.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. **Colorimetric method for determination of sugars and Related Substances.** Analyt. Chem. 28, pp.350-356.

Durret, T., Benning, C. e Ohlrogge, J. 2008. **Plant tyriacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels.** Plant J. 54, pp. 593-607.

Fargasová, A. 1996. **Inhibitive effect of organotin compounds on the chlorophyll content of the green fresh water alga *Scenedesmus quadriculata*.** Environmental Contamination Toxicology, 57, pp. 99 – 106.

Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. 1957. **A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.** The Journal of Biological Chemistry, 226, pp. 497-509.

Gadian, D. G. 1995. **NMR and its applications to living systems.** Oxford: Oxford University Press.

Gao, C.; Xiong, W.; Zhang, Y.; Yuan, W; Wu, Q. 2008. **Rapid quantification of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance.** Journal of Microbiological Methods, 75, pp. 437-440.

Geis, S.W.; Fleming, K.L.; Korthals, E.T.; Searle, G.; Reynolds, L.; Karner, D.A. 2000. **Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay.** Environmental Toxicology and Chemistry, 19, pp. 36-41.

Genicot, G., Leroy, J.L.M.R., Van Soom, A., 2005. **The use of a fluorescent dye, Nile Red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes.** Theriogenology 63, pp. 1181–1194.

Gil, V. M. S., Geraldés, C. F. G. C. 1987. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações.** Lisboa: fundação Calouste Gulbenkin.

Giroldo, D. e Vieira, A.A.H. 2005. **Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir.** J. Plankton res. 27: pp. 695-705.

Gouveia, L.; Oliveira, A. C. 2009. **Microalgae as a raw material for biofuels production.** J. Ind. Microbiol Biotechnol, 36, pp. 269-274.

Guckert, J. B., e K. E. Cooksey. 1990. Triacylglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high-pH induced cell cycle inhibition. J. Phycol. 26: pp.72-79.

Guillard, R.R.L.; Lorenzen, C.J. 1972. **Yellow-green algae with chlorophyllide c.** J. Phycol. 8: pp. 10-14.

Guschina, I.A. & Harwood, J.L. 2006. **Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae.** Prog. Lip. Res. 45: pp. 160-186.

Greenspan, P., Fowler, S.D. 1985. **Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red.** J. Lipid Res. 26, pp. 781–789.

Grima, E. M.; Fernandez, F. G. A.; Camacho, F. G.; Chisti, Y. 1999. **Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up.** Journal of Biotechnology, 70, pp. 231-247.

Hersh, C.M.; Crumpton, W.G. 1987. **Determination of growth rate depression of some of green algae by atrazine.** Environmental Contamination Toxicology, 39, pp. 1041 – 1048.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. 2008. **Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances.** The Plant J. 54, pp. 621-639.

Izard, J., Limberger, R.J., 2003. **Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells.** Journal of Microbiological Methods 55, pp. 411–418.

Kamisaka, Y., Noda, N., Sakai, T., Kawasaki, K., 1999. **Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*.** Biochimica et Biophysica Acta 1438, pp. 185–198.

Khozin-Goldberg, I. e Cohen, Z. 2006. **The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition on the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*.** Phytochemistry 67, pp. 696-701.

Kimura, K., Yamaoka, M., Kamisaka, Y., 2004. **Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile Red fluorescence.** Journal of Microbiological Methods 56, pp. 331–338.

Knothe, G., Gerpen, J. V., Krahl, J., Ramos, L. P. 2006. **Manual de Biodiesel**, Ed. Edgarb Blucher.

Lee, S.J., Yoon, B.D., Oh, H.M.1998. **Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*.** Biotechnology Techniques 12, pp. 553–556.

Lehninger, A.L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 1995. **Princípios de Bioquímica.** 2ª ed. São Paulo: Sarvier, ISBN 85 – 7378 – 026 6.

Lin, R., Ritz, G.P. 1993. **Studying individual macerals using i.r. microspectroscopy, and implications on oil versus gas/condensate proneness and low rank generation.** Org. Geochem. 20, pp. 695–706.

Lorenzen, C.J. 1967. **Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations.** Limnol. Oceanogr. 12, pp. 343-346.

Ma, J., Liang, W. 2001. **Acute toxicity of 12 herbicides to the green algae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, New York, 67, 3, pp. 347-351.

Ma, J.; Chen, J. 2005. **How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility.** Environmental Pollution, Barking, 136, 2, pp. 267-273.

- Mahasneh, I. A. 1997. **Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella* sp (Chlorophyta)**. *Cytobios*, 90, pp.153-161.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K. e Blackburn, S.I. 2003. **The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate**. *J. Phycol.* 63, pp. 145-153.
- Mandal, S., Mallick, N. 2009. **Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, pp. 281-291.
- Marker, A.F.H., Nusch, E.A., Rai, H., Riemann, B. 1980. **The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations**. *Arch Hydrobiology Beih.* 14, pp. 91-106.
- Mcalice, B. J. 1971. **Phytoplankton sampling with the Sedgwick-Rafter cell**. *Limnology and Oceanography*, Baltimore, 16, pp. 19-28.
- Morais, M. G. 2006. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos na sub-área de Bioprocessos em Alimentos Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- Naumann, D. 2000. **Infrared spectroscopy in microbiology**. Em: Meyers, R. A. Ed, *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester: J. Wiley. pp.102-131.
- Nusch, E.A. 1980. **Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination**. *Arch Hydrobiology Beih.* 14, pp. 14-36.
- Osiro, D.; Colnago, L. A.; Otoboni, A. M. M. B.; Lemos, E. G. M.; Souza, A. A.; Coletta Filho, H. D.; Machado, M. A. 2004. **A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence**. *FEMS Microbiology Letters*, 236, pp. 313-318.
- Prestes, R., Colnago, L. A., Forato, L. A., Vizzotto, L., Novotny, E. H., Carrilho, E. 2007. **A rapid and automated low resolution NMR method to analyze the oil quality in intact oilseeds**. *Analytica Chimica Acta*, 596, p. 325-329.

Priscu, J.C., Priscu, L.R., Palmisano, A.C., Sullivan, C.W. 1990. **Estimation of neutral lipid levels in Antarctic sea ice microalgae by Nile Red fluorescence.** *Antarct. Sci.* 2, pp. 149–155.

Raven, P. R., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. 1996. **Biologia vegetal.** 5. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Reinehr, C. O. 2003. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, FURG, Rio Grande.

Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. e Olsen, Y. 1994. **Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae.** *J. Phycol.* 30, pp. 972-979.

Renaud, S.; Luong – Van, T.; Lambrinidis, P. 2002. **Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures.** *Aquaculture*, 211, pp.195-214.

Rigano, V. D. M., Vona, V., Esposito, S., Carillo, P., Carfagna, S., Rigano, C. 1998. **The physiologican significance of light and dark  $\text{NH}_4^+$  metabolism in *Chlorella sorokiniana*.** *Phytochemistry*, 47, pp.177-181.

Rocha, D.Q., Barros, D. K., Costa, E. J. C., Souza, K. S., Passos, R. R., Veiga Junior, V. F., Chaar, J. S. 2008. **Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons.** *Química Nova*, 31, 5, pp. 1062-1066.

Sato, N., Hagio, M., Wada, H. & Tsuzuki, M. 2000. **Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranas.** Em: Harwood, J.L. e Quinn, O.J. *Recent Advances in the Biochemistry of Plant Lipids.* Portland Press, pp. 912-914.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. e Roessler, P.G. 1998. US Department of Energy's Office of Fuels Development, July 1998. **A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from algae, close out report tp-580-24190.** Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Shifrin, N. S.; Chisholm, S. W. 1981. **Phytoplankton lipids: inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles.** *Journal of Phycology.* 17, pp.374-384.



Silverstein, R. N.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. 1994. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. São Paulo: Guanabara.

Spoehr, H.A. & Milner, H.W. 1949. **The chemical composition of *Chlorella*: effect of environmental conditions**. Plant Physiol. 24, pp. 120-149.

Stevenson, F. J. 1994. **Humus chemistry: gênesis, composition, reactions**. 2. ed. New York: John Wiley.

Stuart, B. 1996. **Modern infrared spectroscopy: analytical chemistry by open learning**. New York: John Wiley.

Tang, J., Hoagland, K. D., Siegfried, B. D. 1998. **Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae**. Environmental Toxicology and Chemistry, New York, 17, 6, pp. 1085-1090.

Tonial, I. B., Matsushita, M., Souza, N. E., Perini, J. A. L., Morais, D. R., Bani, F. A., Visentainer, J. V. 2009. **Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca**. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 59, 1, p. 78-81.

Vanini, L., *et al.* 1996. **Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for data capture in predictive microbiology**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 12.

Vieira, A.A.H. e Myklestad, S. 1986. **Production of extracellular carbohydrates in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyta)**. J. Plankton Res. 8, pp.985-994.