UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ALEJANDRA IRINA EISMANN

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE ISOCHRYSIS GALBANA EM CULTIVO ELETROESTIMULADO E ENRIQUECIDO EM CO2

RIO DE JANEIRO 2014

ALEJANDRA IRINA EISMANN

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE ISOCHRYSIS GALBANA EM CULTIVO ELETROESTIMULADO E ENRIQUECIDO EM CO₂

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica.

Orientadores: José Luiz de Medeiros, D. Sc. e Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph. D.

Rio de Janeiro – Brasil 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Eismann, Alejandra.

Respostas bioquímicas e morfológicas de *Isochrysis galbana* em cultivos eletroestimulado e enriquecido em CO₂ / Alejandra Irina Eismann. – 2014. f 97. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: José Luiz de Medeiros; Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo.

1. Microalga. 2. Campo elétrico. 3. Ácidos graxos poliinsaturados. 4. Biocombustíveis. I. Medeiros, José Luiz; Queiroz, Ofélia. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Respostas bioquímicas e morfológicas de *Isochrysis galbana* em cultivo eletroestimulado e enriquecido em CO₂.

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE ISOCHRYSIS GALBANA EM CULTI-VO ELETROESTIMULADO E ENRIQUECIDO EM CO₂

Alejandra Irina Eismann

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Aprovada por:

Prof. José Luiz de Medeiros, D.Sc. – Orientador

Profa. Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph.D. – Orientadora

Profª Marcia Monteiro Machado Gonçalves, D.Sc.

Prof^o Ricardo Moreira Chaloub, D.Sc.

Prof^ª Priscilla Filomena de Amaral, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil Fevereiro de 2014

A meu pai, mãe e irmã pela entrega, apoio e compreensão nas minhas escolhas.

A Poli e Gabi por compartir suas vidas comigo.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores deste trabalho Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo e José Luiz de Medeiros pela oportunidade para trabalhar e aprender no Laboratório H2CIN, pela confiança e sempre boa disposição.

A Marta Cristina Picardo pela amizade, porque foi fundamental para a realização deste trabalho, e pelo apoio em todo momento na hora de realizar os experimentos.

A Ricardo Moreira Chaloub e Anita Ferreira da Silva pelo acolhimento no Laboratório LEAF- IQ/UFRJ.

A Claudia Mendieta Pacheco pela amizade e por trabalhar junto nas técnicas experimentais, e pela análise de FAMEs desenvolvida no trabalho.

Ao resto do pessoal do Laboratório H2CIN, especialmente a Wagner pelo auxilio técnico e a Mariana pela amizade e companheirismo.

Aos professores e funcionários do programa pela dedicação e esforço em melhorar cada dia mais.

Ao CNPq e Universidad Nacional Genaral San Martin (UNSAM, Argentina) pelo apoio financeiro.

"Educando pessoas para serem, apenas, admiráveis engenheiros, brilhantes cientistas, dirigentes capazes, artífices peritos, nunca se promoverá a união dos oprimidos com os opressores; e evidentemente nosso atual sistema de educação, que sustenta muitas causas que geram inimizade e ódio entre os seres humanos, nunca impediu o assassínio em massa, em nome da pátria ou em nome de Deus".

(Krishnamurti, 1957, A educação e o Significado da Vida)

Resumo

EISMANN, Alejandra Irina. **Respostas bioquímicas e morfológicas de** *Isochrysis galbana* em cultivo eletroestimulado e enriquecido em CO₂. Orientadores: Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo e José Luiz Medeiros. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado Profissional em Bicombustíveis e Petroquímica). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

Isochrysis galbana, apresenta potenciais aplicações na captura de CO₂ associada a coprodução de energia e de metabolitos de alto valor agregado como ácidos graxos ômega-3 e fucoxantina. Os rendimentos em biomassa dos cultivos de microrganismos podem ser melhorados através de estímulos metabólicos de natureza físico-química. Por tal motivo, o presente trabalho visa avaliar o impacto de um campo elétrico de baixa intensidade na morfologia e composição bioquímica de cultivos densos de *I. galbana* crescidos com ar enriquecido em CO₂. Para tal foram crescidas culturas em batelada com campo elétrico constante de (0,65 ± 0,1)V entre dois eletrodos de platina imersos no cultivo. Foram realizados três tipos de crescimento: sem aplicação de potencial elétrico, e com estimulação elétrica durante todo o crescimento ou na fase estacionária. Foi determinada a concentração celular e nitrato no meio de cultura diariamente; e foi analisada: a quantidade de pigmentos (clorofila a, c e carotenóides) por célula; a composição percentual na biomassa seca de lipidios totais, carboidratos e proteínas totais; e a composição de ácidos graxos do extrato lipídico de três dias de cultivo. Também foi estudado o impacto do potencial no alongamento celular através de fotografias de microscopia ótica. O campo elétrico intensificou alongamento celular característico das culturas envelhecidas da microalga e induziu a aparição de diversas morfologias. Também reduziu a quantidade de pigmentos e de lipídios na biomassa, e aumentou a percentagem dos ácidos docosaexaenóico (DHA) e oléico no extrato lipídico. O DHA é um ácido graxo ômega- 3 de grande valor nutricional requerido para evitar graves doenças mas insuficiente para atender a demanda global. Tal molécula poderá ser extraída da biomassa de I. galbana prévia a formulação de bicombustíveis. Portanto, a aplicação de campos elétricos de baixa intensidade constitui uma ferramenta que deve continuar sendo avaliada com o fim de maximizar os rendimentos de DHA e minimizar a perda de lipídios.

vii

Abstract

EISMANN, Alejandra Irina. Respostas bioquímicas e morfológicas de Isochrysis galbana em cultivo eletroestimulado e enriquecido em CO₂. Orientadores: Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo e José Luiz Medeiros. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado Profissional em Biocombustíveis e Petroquímica). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

Isochrysis galbana has potential application in CO₂ capture associated with energy and high valuable molecules, as ômega-3 fatty acids and fucoxanthin, production. The application of physico- chemical stimulus in microorganism cultures to manipulate its metabolism can be used for optimization of biomass yields. Thought the present study aims to evaluate the biochemical composition and morfologhy of microalgae dense cultures enriched in CO_2 and stimulated with a low intensity electric field. *I. galbana* was batch cultured under a constant electric potential (0,65 ± 0,1)V induced between two platinum electrodes immersed into the culture. Three groups of experiments were performed: without potential stimulus, stimulated during all growth, or during the stationary phase. Cell concentration and inorganic nitrate in culture medium was daily determinate; total lipids; total proteins; and carbohydrates in dry biomass; fatty acids methyl esters in lipid extract; and cell pigment (chlorophylls a, c and carotenoids) concentration was analyzed in three days of growth. The impact of the electric field on cell elongation was also investigated. The electric field intensified cell elongation of elderly cultures. Also, the electric field reduced pigments and lipids in biomass, and augmented docasahexaenoic (DHA) and oleic acid in lipid extract. The DHA is an ômega-3 fatty acid with high nutritional value, although insufficient to attend global demand. Electric field remains a novel strategy that should be evaluated in different configurations to maximize DHA production and to reduce lipid degradation.

Índice

Capítulo 1- Introdução	1
1.1 Objetivo	3
1.2 Estrutura da Dissertação	3
Capítulo 2- Revisão Bibliográfica	4
2.1 Protocolo de Kyoto	4
2.2 Biocombustíveis	5
2.2.1 Bioetanol	7
2.2.2 Biodiesel	9
2.3 Ácidos graxos insaturados	10
2.4 Algas	14
2.4.1 Classificação	14
2.4.2 Nutrição	15
2.4.3 Incorporação de carbono inorgânico	16
2.5 Lipídios	17
2.5.1 Síntese de glicerolípidos de microalgas	19
Desaturação e elongação das cadeias de 16 e 18C	20
2.6 Cultivo de microalgas	21
2.6.1 Estimulação metabólica	22
Eletroestimulação	26
Aplicação de campos elétricos em fermentação	31
Aplicações de campos eletromagnéticos em cultivos de micro	oalgas34
2.7 Isochrysis galbana	36
Capítulo 3- Materiais e Métodos	41
3.1 Microrganismo	41
3.1.1 Aclimatação prévia	41
3.1.2 Inoculação	41
3.2 Condições de cultivo	42
3.2.1 Meio de cultivo	42
3.2.2 Fotobiorreator	43
3.2.3 Aeração	44
3.2.4 Temperatura	44
3.2.5 Iluminação	44
3.2.6 Eletroestimulação	45
3.3 Procedimento experimental	46
3.4 Análise e processamento da biomassa	47
3.4.1 Coleta e secagem	47
3.4.2 Crescimento celular	47
3.4.3 Nitrato residual	47

3.4.4	Pigmentos	48
3.4.5	Morfologia celular	49
3.4.6	Lipídios totais	49
3.4.7	Metil ésteres de ácidos graxos (FAMEs)	50
3.4.8	Carboidratos	51
3.4.9	Proteínas totais	51
Capítulo 4	4- Resultados e Discussão	52
4.1 0	Cinética de crescimento e consumo de NO3 ⁻	52
4.2 <i>A</i>	Análise de biomassa seca: proteínas, carboidratos e lipídios	55
4.3 F	Pigmentos: clorofila a, c e carotenóides	58
4.4 M	Metil ésteres de ácidos graxos (FAMEs)	60
4.5 I	ntegridade e morfologia celular	64
Capítulo 5	5- Conclusões e Considerações finais	69
Capítulo é	5- Referências Bibliográficas	71

Índice de Figuras

Figura 2.1. Principais países s produtores de bietanol e biodies	sel em 2009 6
Figura 2.2. Breve histórico dos biocombustíveis no Brasil.	7
Figura 2.3. Principais matérias primas empregadas na produçã	ão de
bioetanol.	8
Figura 2.4. Nomenclatura de PUFA.	11
Figura 2.5. Síntese de ácidos graxos em mamíferos.	12
Figura 2.6. Dissolução de carbono inorgânico em água. em fu	nção de pH. 17
Figura 2.7. Transporte de carbono inorgânico através da mem	brana
plasmática e de cloroplasto em algas eucariotas m	arinhas. 17
Figura 2.8. Fosfatidilcolina, glicerolípidios majoritário da me	mbrana
plasmática.	19
Figura 2.9. Desaturação e elongação dos ácidos graxos de 16	e 18 C. 20
Figura 2.10. Produção de D. salina (700 ha de lago salino).	22
Figura 2.11. Esfera perfeita em campo elétrico e Reordenamer	nto de
cargas na membrana por ação de campo elétrico.	29
Figura 2.12. Interação de campo elétrico (U) com proteínas, aç	cúcares e
lipídios das membranas.	30
Figura 2.13. Reator com células e circuito equivalente, conside	erando cada
célula como uma esfera dielétrica perfeita.	31
Figura 2.14. I. galbana.	37
Figura 2.15. Possível via de desaturação e elongação de ω-3 en	m I. galbana 39
Figura 3.1. Procedimento de inoculação de <i>I. galbana</i> .	42
Figura 3.2. Fotobiorreator utilizado para cultivo de Isochrysis	s galbana 44
Figura 3.3. Arranjo experimental simplificado, com aeração, e	eletrodos e
Potenciostato	45
Figura 3.4. Votamograma obtido por voltametria cíclica	46
Figura 3.5. Configuração experimental e dias de amostragem	47
Figura 4.1 Cinética de crescimento de I. galbana e concentraç	$ao de NO_3^-$
(azul) no meio.	53
Figura 4.2. Carboidratos (a); lipídios (b); e proteínas (c) na bio	omassa de <i>I</i> .
galbana.	56

Figura 4.3.	Quantidade (µg/ célula) de clorofila a (Chla) (a), clorofila c	59
	(Chlc) (b), e carotenoides (c).	
Figura 4.4.	Composição em FAMEs do extrato lipídico de I. galbana.	63
Figura 4.5.	Fotografias de I. galbana e de fluorescencia (microscópio	
	ótico, 100x filtro vermelho).	65
Figura 4.6.	Fração cumulativa x Índice de esfericidade de I. galbana	67
Figura 4.7.	Fotografias típicas de I. galbana (microscópio ótico, 100x)	68

Índice de Tabelas

10
13
15
32
35
43

Capítulo 1- Introdução

As atividades antropogênicas dos países desenvolvidos têm impactado negativamente no planeta (UNFCCC, 2013). A UNFCCC (2013) anuncia que para evitar a elevação da temperatura do planeta de 2º C deve-se reduzir as emissões rapidamente (UNFCCC 2013). As energias renováveis diminuiriam a dependência por grandes corporações e facilitariam o acesso de toda a população (Cúpula dos Povos, 2012). Fontes de biomassa tradicionais (como lenha e carvão vegetal) são utilizadas há séculos para produção de energia, embora a queima dessas fontes seja um processo ineficiente. Portanto, novas fontes e rotas tecnológicas devem ser incorporadas ao setor (IPPC, 2011). Os biocombustíveis líquidos como bioetanol, biodiesel e diesel de aviação representam um exemplo de produção alternativa de bioenergia. Não entanto, a produção desses coloca em risco a segurança alimentar e dos trabalhadores informais das terras definidas como marginais, além de impactos nos ecossistemas (IPPC, 2011; Cúpula dos Povos, 2012).

As microalgas para sequestro de CO₂ e produção de combustíveis apresentam-se como uma solução aos conflitos relacionados ao emprego de plantas terrestres e são fontes de vários metabólitos, entre outras vantagens (Chisti, 2013; NREL, 2010). Neste sentido, a espécie Isochrysis galbana apresenta-se como boa candidata pois pode atingir elevadas concentrações de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) (Alfonso et al., 1992) e representa uma fonte potencial de bioenergia (Picardo et al., 2013b; Sanchez et al., 2013). Os PUFAs de cadeia longa (LC-PUFAs), como o ácido araquidônico (ARA), o eicosapentaenoico (EPA) e o docosaexaenoico (DHA), são utilizados como suplementos alimentares de formulações para a alimentação infantil e de grávidas, e dietas de adultos devido aos comprovados efeitos benéficos na saúde e no desenvolvimento infantil. Adicionalmente, os PUFAs são importantes para a aquicultura por exercerem um papel central no desenvolvimento de larvas de moluscos e peixes. As fontes comercias são óleos de peixes marinhos e culturas de microrganismos heterotróficos, como algas e fungos. No entanto, estima-se que os primeiros não satisfaçam a demanda, entre outras desvantagens reportadas (Adarme Vega, et al., 2012). Com o avanço no desenvolvimento de cultivos de microalgas nos últimos anos,

espécies fotoautotróroficas poderiam ser empregadas na produção de tais moléculas (Khozin- Goldberg *et al.*, 2011).

A produção de biomassa algácea em grande escala representa a etapa do processo com maiores desafios de sustentabilidade econômica e ambiental, demandando estratégias para viabilidade econômica da produção (Chisti, 2013), como otimização dos parâmetros operacionais e direcionamento do metabolismo por estímulos fisicoquímicos ou alterações genéticas (Courchesne et al., 2009). Para a produção de lipídios e ácidos graxos específicos tem sido induzido estresse metabólico por deficiência de nutrientes, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e osmolaridade do meio (Hu *et al.*, 2008), havendo exemplos de indução por eletrólise do meio, e por aplicação de campos magnéticos e eletromagnéticos (Hunt *et al.*, 2009).

Estudos anteriores (Ci *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010) observaram que campos elétricos de baixa intensidade podem induzir mudanças no metabolismo de microrganismos. Ci *et al.* (1998) estudaram a resposta em intensidade de corrente de uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* frente a intensidades variáveis de potencial elétrico (voltametrias), reportando um pico de corrente a 0,75Vsce. Ci *et al.* (1998) e Araujo et al., (2004) aplicaram tal potencial no cultivo dessa levedura e observaram diferenças no crescimento em relação ao obtido em culturas sem potencial elétrico. A membrana plasmática é a primeira estrutura celular afetada pela aplicação de campo elétrico posto que o campo elétrico promove grande pressão e acúmulo diferencial de cargas com consequente diminuição do potencial transmembrana, afetando a permeação através de canais iônicos, e interferindo nos momentos dipolares, podendo alterar a eletroestática e conformação através da indução de torque (Mark, 2008). Portanto, a aplicação de campos elétricos de baixa intensidade é uma ferramenta potencial para alterar o perfil bioquímico de microalgas e não foi descrito na literatura pesquisada.

Neste trabalho, investiga-se a aplicação de campo elétrico em cultivos densos de *I. galbana* associado a elevada concentração de CO_2 com o intuito de promover a produção de metabólitos de interesse industrial como co-produtos de alto valor agregado visando à viabilidade econômica de arranjos produtivos de biocombustíveis derivados de microalgas.

1.1 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é o de avaliar respostas bioquímicas de microalga marinha *Isochrysis galbana* crescidas em alta concentração de CO₂ e estimuladas com campo elétrico de baixa intensidade.

Como objetivos específicos, o estudo contempla avaliar:

- Crescimento celular visando maximizar produção de biomassa

- Produção das frações lipídio, proteína e carboidrato;

- Avaliara o perfil de ácidos graxos visando à obtenção de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa;

- Avaliar a resposta morfológica e a integridade celular.

1.2 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está estruturada em capítulos. No primeiro Capítulo, a motivação e relevância do tema de estudo foram apresentadas, assim como os objetivos que definem o escopo da Dissertação. No Capítulo 2, a literatura é revista para levantar o estado da arte, e a construção do arcabouço metodológico do estudo. A metodologia experimental é apresentada no Capítulo 3, e os resultados e discussão deles são expostos no Capítulo 4. As conclusões e sugestões de continuação da linha de pesquisa adotada é sugerida no Capítulo 5, que é seguido por Capítulo de Referências Bibliográficas (Capítulo 6)

Capítulo 2- Revisão Bibliográfica

Este capítulo apresenta o levantamento do estado da arte no cultivo de microalgas como matéria prima para a produção de biocombustíveis e de produtos de alto valor agregado.

2.1 Protocolo de Kyoto

O incremento na atmosfera dos gases de efeito estufa desde 1750 – era préindustrial – está associado às atividades antropogênicas, sendo responsabilizado pelo comprovado aquecimento global (IPPC, 2011). O CO₂, apesar de ser o GEE com menor potencial de aquecimento, tem o maior impacto nas mudanças climáticas devido à maior concentração na atmosfera (IPPC, 2011).

Com o objetivo de estabilizar as concentrações dos GEE na atmosfera no nível necessário para evitar interferências perigosas entre as atividades antropogênicas e o clima, foram criados tratados internacionais. A ONU coordena ações referentes ao meio ambiente através do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA). Tal órgão incorporou o termo sustentabilidade no discurso público e deu origem ao Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPPC) (1988) e à Convenção Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (UNFCCC) (ECO'92, Rio de Janeiro). Enquanto o IPPC atua como fonte de assessoramento científico, a UNFCCC toma as decisões globais referentes a mudanças climáticas através de reuniões anuais – "Conferência das Partes (COP)". A convenção estabeleceu compromissos de redução de emissões de GEE seguindo o principio de "responsabilidade comum porém, diferenciada", porque os países industrializados emitiram mais GEE do que os não industrializados ou com economias em transição (UNFCCC 2013). Atualmente, 195 países ratificaram o acordo, considerados as "Partes da Convenção", e se reúnem anualmente nas "Conferência das Partes" (COP) (UNFCCC 2013).

Como o compromisso político de redução de emissões não foi suficiente, adotouse um protocolo que obriga as Partes a adotarem metas quantitativas de redução. Na terceira reunião da COP (COP-3, 1997, Kyoto Japão), foi estabelecido o Protocolo de Kyoto, um acordo internacional que compromete legalmente os países desenvolvidos a ter metas de redução de emissões. O Protocolo encontra-se estruturado a partir dos princípios da UNFCCC. Atualmente, são 192 Partes ratificadoras do acordo e deve vigorar no período 2013-2020 (UNFCCC, 2013).

A primeira fase do Protocolo foi de 2008 até 2012. Estabelecia a redução das emissões dos GEE (de 37 países mais a UE) em uma média de 5,2% em relação aos níveis de 1990. Em dezembro do 2012, aconteceu a COP18 em Doha, Qatar aonde as Partes da Convenção adotaram uma emenda ao Protocolo de Kyoto para continuar com uma segunda fase de compromisso (2012-2020) (Emenda de Doha). Neste segundo período, as Partes se comprometeram em reduzir em 18% as emissões dos GEE em relação aos níveis 1990. No entanto, para o início da segunda fase ainda são necessárias aceitações formais de pelo menos 75% das Partes do Protocolo. Contudo, as Partes têm direito a aplicar provisionalmente a Emenda de Doha, embora não tenha entrado em vigor, se assim o desejarem (UNFCCC, 2013).

Um dos problemas reconhecidos pela Convenção é a falta de cumprimento das promessas de redução pelos países desenvolvidos já que as emissões globais continuam aumentando (UNCCC, 2013). No entanto, o relatório técnico do Programa Ambiental das Nações Unidas (*United Nations Environment Programme*, UNEP, 2012) estima que, embora exista um descompasso entre as promessas e as realizações, ainda é possível reduzir as emissões a nível necessário para limitar a elevação de temperatura em 2°C se ações rápidas e concentradas forem adotadas. Adicionalmente, existem vários exemplos de redução exitosos ao redor do mundo que poderiam ser adotados (UNEP, 2012).

2.2 Biocombustíveis

A produção de biodiesel, bioetanol e diesel de aviação cresceu rapidamente nos últimos anos, chegando a suprir o 3% dos combustíveis usados no setor de transporte em 2009. Tal crescimento sobre as demais fontes de energia renovável se deve ao fato de que podem ser utilizados com a infraestrutura e especificações técnicas já disponíveis para os combustíveis fósseis (diesel, etanol, gasolina e diesel de aviação) com poucas ou sem modificações (U.S. DOE, 2010). Não obstante, para produzi-los, são necessárias políticas mandatórias, incentivos fiscais e subsídios dos governos (Do Amaral e Costa, 2009). Na figura 2.1 observa-se a produção de biocombustíveis por país.



Figura 2.1. Principais países produtores de bietanol e biodiesel em 2009. Fonte: IPPC (2011)

As fontes principais de biocombustíveis são cana de açúcar, milho, soja e sorgo (IPPC, 2012). Contudo, tanto a UNFCCC como a Cúpula dos Povos (2012) alertaram que o emprego de plantas terrestres na produção de biocombustíveis gera problemas associados à segurança alimentar, à perda de biodiversidade, e à migração de comunidades nativas ou de trabalhadores informais das terras caracterizadas como de "baixa eficiência" (IPPC, 2012; Cúpula dos Povos, 2012). Foi comprovado que a produção de biocombustíveis impactou no preço dos alimentos embora a área de terra utilizada tenha sido menor ao 1% das terras cultiváveis (IPPC, 2011).

Na Figura 2.2, observa-se um relato histórico da implementação de biocombustíveis no Brasil, produzido pela Agencia Nacional de Petróleo e Biocombustíveis (ANP, 2013).



Figura 2.2. Breve histórico dos biocombustíveis no Brasil. Fonte: ANP (2013)

2.2.1 Bioetanol

O bioetanol é produzido hidratado (com 6% de água) ou anidro (com 0,4% de agua). Esse último requer etapa adicional de desidratação, e é aceito para misturar à gasolina pela maioria dos motores, em qualquer proporção. Uma exceção é o motor *flex-fluel* (brasileiro), que aceita qualquer mistura de etanol hidratado. Quando comparado com a gasolina, o etanol permite uma combustão mais limpa e melhor desempenho nos motores, no entanto a energia produzida na combustão do etanol é 30% (aproximadamente) da produzida pela queima do derivado fóssil (Macedo *et al.*, 2010).

O Brasil teve uma ampla trajetória na produção de bioetanol combustível ao longo do século XX com estímulos inconstantes por parte dos governos. Tal produção foi respaldada pelo amplo conhecimento do cultivo e do processamento da cana de açúcar. Uma das políticas chaves do setor foi a criação do Programa Nacional de Álcool (Pro Álcool) em 1974 (Figura 2.2).

O bioetanol é produzido por fermentação alcoólica da glicose e, portanto, requer biomassa com alto teor de açúcares. Ainda em estágio de desenvolvimento, têm-se tecnologias que empregam biomassa amilácea (rica em amido) ou celulósica (rica em fibras) pré-tratrada (BNDES, 2008). Atualmente, a cana de açúcar no Brasil e o milho nos EEUU são responsáveis por 70% da produção mundial de bioetanol. O restante corresponde a tecnologias que empregam mandioca, trigo, beterraba açucareira e batata doce, conforme mostrado na Figura 2.3 (BNDES, 2008). Existem espécies de algas que são boas acumuladoras tanto de glicose como de amido e celulose (especialmente as macroalgas, embora microalgas já estão sendo pesquisadas) e seriam, portanto, fonte potencial de bioetanol (U.S. DOE, 2010).



Figura 2.3. Principais matérias primas empregadas na produção de bioetanol. Fonte: BNDES (2008)

A substituição de gasolina por bioetanol reduziu as emissões de GEE e de outras substâncias tóxicas na atmosfera, já que, de forma simplificada, se considera que a quantidade de CO_2 queimada é a mesma utilizada pela planta para crescer. O emprego de cana de açúcar como matéria prima diminui em até 80% tais emissões devido à forma de produção de etanol nas usinas, que aproveita o bagaço de cana na geração de energia térmica e vapor (Macedo *et al.*, 2004).

2.2.2 Biodiesel

O biodiesel representa uma alternativa ao óleo diesel de origem fóssil que pode ser utilizado de forma integral ou misturado com o óleo diesel nos motores. No Brasil, começou a ser adicionado ao diesel na proporção de 2% ("B2") em 2005, passando a 5% ("B5") a partir de 2010 (Figura 2.2). Atualmente, as produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP transesterificam o óleo com metanol para produzir biodiesel. Em tal reação, os triglicerídeos (TAG) são convertidos em ésteres metílicos ou etílicos (se a transesterificação empregar etanol) de ácidos graxos, denominados "FAME" (*fatty acid methyl ester*) ou "FAEE" (*fatty acid ethyl ester*). Todos os FAMEs ou FAEEs devem cumprir com as especificações de padrões internacionais (EN-14214 ou ASTM D-6751) (ANP, 2013).

Enquanto o biodiesel é uma mistura de FAMEs ou FAEEs, o derivado fóssil são hidrocarbonetos predominantemente apolares. Dentre as vantagens do biodiesel, tem-se a menor emissão de compostos policíclicos aromáticos (e cancerígenos) à atmosfera, maior número de cetano e maior lubricidade. Como desvantagens, tem-se que a maioria dos biodieseis emitem maior quantidade de NOx (que tem alto potencial de aquecimento global) e possuem menor estabilidade oxidativa e resistência ao fluxo frio (Focke *et al.*, 2011). As propriedades físicas do biodiesel se encontram sujeitas à composição química da matéria prima. A maioria dos FAMEs derivados dos óleos vegetais são: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) e linolênico (18:3n-3). Maiores concentrações dos FAMEs saturados produzirá combustíveis com elevado ponto de turvação, maior viscosidade e maior probabilidade de entupimento do motor. No entanto, se o combustível tiver altas concentrações de FAMEs insaturados, esse apresentará baixa estabilidade oxidativa (Freire *et al.*, 2012).

Existem centenas de fontes de óleo ou gordura com potencial para produzir biodiesel, que representam ao redor do 75% do custo final do biodiesel (Gazzoni *et al.*, 2012). Estas matérias primas podem ser agrupadas em óleos comestíveis (*e.g.*, soja, canola, girassol, dendê, amendoim, babaçu), óleos não comestíveis (pinhão manso, mamona, *Jatropha curcas, Calophyllum inophyllum, Moringa oleifera* e *Croton megalocarpus*), gorduras animais (gordura de frango, banha de porco, sebo bovino e gordura de aves) e óleos de rejeito de cozinha (ANP, 2013). No entanto, atualmente

mais de 80% da produção mundial de biodiesel é de canola, seguido por soja e palma (ANP, 2013).

O biodiesel de microalga, atualmente em etapa de pesquisa, ganhou destaque por atingir as maiores produtividades teóricas de óleo, com valores típicos de lipídio na biomassa seca de 20-40 % e 70-80% em casos excepcionais. A Tabela 2.1 mostra valores típicos de produtividade de óleo a partir de cultivos de plantas oleaginosas e de microalga, destacando-se entre as primeiras a palma, cerca de 10 vezes menos produtiva do que microalgas.

Fonte	Produtividade de óleo (L/ha)	
Mamona	806	
Pinhão manso	1892	
Milho	172	
Soja	446	
Canola	1190	
Palma	5950	
Microalga*	58700	
* espécies com 30% de óleo na biomassa		

Tabela 2.1. Produtividade de biodiesel. Fonte: Pereira et al. (2012), baseado em Chisti
et al. (2008) e Dibenedeto et al. (2011).

2.3 Ácidos graxos insaturados

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeias hidrocarbonadas com 4 a 26 átomos de carbono (C), no entanto os de maior ocorrência são cadeias de número par entre 12 e 24 C. Os ácidos graxos insaturados apresentam uma ou mais duplas ligações, geralmente em posição *cis* e separadas por um grupo metileno (i.e., $-CH_2=CH_2-CH_3 CH_2=CH_2-$). São denominados com o número de carbonos da cadeia, seguido do número de instaurações (Nelson *et al.*, 2001). Para especificar o lugar das instaurações, existem duas denominações, ilustradas na figura 2.4, dependendo do carbono número 1 (C1) escolhido para começar a contagem:

- C1 carboxílico: denominação "Δ", na qual se especificam todas as instaurações, e

- C1 metílico: denominação "ômega (@)", especifica-se apenas a primeira instauração.

Figura 2.4. Nomenclatura de PUFA (a) ácido linoléico 18:2 ∞ 6 ou 18:2 $\Delta^{9,12}$ e (b) ácido α -linolênico 18:3 ∞ 3 ou 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. Os números indicados acima de cada cadeia correspondem à designação ∞ , e os números abaixo representam a designação Δ .

A denominação Δ é utilizada para síntese química, enquanto a ω é a mais difundida no campo da saúde, principalmente devido aos efeitos dos ω 3 e ω 6 (Nelson, 2001).

Os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) conferem fluidez, flexibilidade e permeabilidade seletiva às membranas celulares e, também, estão envolvidos na sinalização celular. Os PUFAs das membranas animais são precursores de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos: hormônios envolvidos nas respostas inflamatórias, na vasodilatação, na pressão arterial, febre e dor. Os PUFAs docosaexaenoico (DHA, 22:5 ∞ 3), eicosapentaeico (EPA, 20:5 ∞ 3) e araquidônico (ARA, 20:4 ∞ 6) foram os mais caracterizados devido aos comprovados efeitos benéficos na saúde. O DHA está presente nas membranas cerebrais e na retina; o ARA nas membranas cerebrais; e o EPA no sistema cardiovascular (Ward e Singh, 2005).

No entanto, nas dietas ocidentais, há um desequilíbrio na proporção $\omega 3/\omega 6$ de PUFAs ingeridos e na quantidade líquida de ARA, DHA e EPA consumida. Ward e Singh (2005) destacam que o ser humano evoluiu com uma relação $\omega 3/\omega 6$ de 1/1 na alimentação. Contudo, nos últimos 100 anos foi consumido entre 10 a 25 vezes mais $\omega 6$ do que $\omega 3$. Tal desproporção é causada pelas alterações nas dietas e nas formas de produção de alimentos, como carnes de animais e produtos industrializados. Como esse desequilíbrio é promotor de doenças graves, diferentes organizações internacionais recomendaram a introdução de ARA, EPA e DHA nas fórmulas infantis e nos suplementos nutricionais para adultos e para mulheres grávidas ou em aleitamento (Ward e Singh, 2005).

Todos os $\omega 3$ e $\omega 6$ são considerados essenciais para os seres humanos e devem ser tomados da dieta (Rubio- Rodriguez *et al.*, 2010). Embora nos animais o 18:2 ω -6 e o 18:3 ω -3 possam ser convertidos em ARA, EPA e DHA (Figura 2.5) (Nelson *et al.*, 2001), as taxas de conversão são baixas, portanto são considerados essenciais (Rubio-Rodriguez *et al.*, 2010).



Figura 2.5. Síntese de ácidos graxos em mamíferos. No citosol celular, é sintetizado ácido palmítico (16:0), palmitoleico (16:1 ∞ 7), esteárico (18:0) e oléico (18:1 ∞ 9). O ácido linoleico (precursor dos ∞ 6) assim como o α -linolénico (precursor ∞ 3) devem adquiridos da dieta. Fonte: Nelson *et al.*, (2001).

A fonte principal de PUFA ω 3 são óleos de peixes gordurosos (Rubio- Rodriguez *et al.*, 2010). A extração de PUFA dos óleos de peixes é fortemente questionada porque não conseguirá atender a demanda futura, tem risco de contaminação (com metais pesados, compostos orgânicos e dioxinas), possui sabor e aroma desagradáveis, e apresenta pouca estabilidade oxidativa (Ratledge, 2004). Além disso, no óleo de peixe coexistem vários tipos de PUFAs em proporções similares, enquanto as fórmulas nutricionais requerem um único ácido graxo ω 3 (*e.g.*, DHA no alimento infantil) pois a presença de outro ω 3 pode ter efeitos negativos (Ratledge, 2004). Biomassas descritas na literatura como fontes de um único PUFA são: microrganismos produtores de óleo,

plantas transgênicas ou macroalgas (Ratledge et al., 2004; Rubio- Rodriguez et al., 2010).

O óleo microbiano se denomina "single cell oil" ou "SCO". Alguns exemplos comerciais são: DHASCO (produzido pelo dinoflagelado *Crypthecodinium cohnii*) e ARASCO (produzido pelo fungo *Mortierella alpina*). O uso destes em misturas nas formulações infantis atingiu 700 toneladas em 2004 (Ratledge, 2004; Ward e Singh, 2005). Reporta-se na literatura a seleção de espécies e cepas, e a variação de parâmetros operacionais de cultivo com o fim de se otimizar o rendimento de PUFA, assim como avanços em engenharia genética (Molina Grima *et al.*, 1992; Ward e Singh, 2005). A Tabela 2.2 exibe alguns dos microrganismos conhecidos com potencial para a produção de PUFAs.

Tabela 2.2. Microrganismos produtores de óleo com potencial de aplicação na produção industrial de PUFAs. Adaptado de Ward e Singh (2005) e Adarme-Vega *et al.* (2012). GLA: ácido alfa-linolénico (18:2ω3); EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5 ω3); DHA: ácido docosaexaenoico (22:6ω3); ARA: ácido araquidônico (20:4 ω6)

Fungos (ou relacionados)	
Mortierella sp.	GLA
Mucor sp.	GLA
Mucor circinelloides	GLA Curta produção comercial 15%p/p
Cunninghamella sp.	GLA
Mortierella alplina	ARA
Mortierella schmuckeri	ARA Comercial
Pithium insidiosum ATCC 28251	ARA Comercial
Microalgas heterotróficas	
Crypthecodinium cohnii	DHA Comercial, entre 10 e 50% p/p
Schizochytrium SP	
Nitzschia SP.	EPA
Microalgas fotoautótrofas	
Porphyridium cruentum	ARA 2%, p/p
Parietochloris incise	
Nannochloropsis SP	EPA + DHA
Pinguiococcus pyrenoidosus	
Thraustochytrium sp.	
Pavlova viridis	
Pavlova lutheri	
Isocrysis galbana	7
Chlorella minutíssima	EPA
Dunaliella salina	1

As microalgas são organismos produtores primários de PUFAs na cadeia alimentar, os quais são transpassados ao resto do ecossistema marinho. Portanto, são empregadas em aquicultura dado que o EPA garante o desenvolvimento de moluscos, bivalves e peixes pequenos; e como alimento de animais, como aves para a produção de ovos com alto teor de PUFA ω 3. Com os avanços relacionados à produção de biocombustíveis de microalgas fotoautotróficas, espera-se que no futuro a produção de PUFA desses organismos seja rentável (Adarme Vega, 2012; Khozin- Goldberg, 2011).

2.4 Algas

O termo "alga" não possui valor taxonômico formal, mas refere- se a um grupo de organismos com capacidade fotossintética ou com relação a formas pigmentadas (Barsanti e Gualtieri, 2006). Abrange espécies (entre 1 e 10 milhões) de linhagens evolutivas diferentes tanto procariotas como eucariotas. Existem algas unicelulares (microalgas) ou multicelulares macroscópicas (macroalgas). A grande diversidade do grupo reflete-se no habitat, tipo de metabolismo, organização e morfologia celular, pigmentos, polissacarídeos estruturais e de reserva, e metabolitos específicos (Barsanti e Gualtieri, 2006).

2.4.1 Classificação

Existem duas divisões de algas procariotas: Cyanophyta e Prochlorophyta, e nove divisões de algas eucariotas: Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Prymnesiophyta (ou Haptophyta), Criptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta e Chlorophyta, apresentados na Tabela 2.3, (Barsanti e Gualtieri, 2006).

Reino	Divisão	Classe
Prokaryota	Cyanophyta	Cyanophyceae
Eubacteria	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Dhadanhyta	Bangiophyceae
	Rhodophyta	Florideophyceae
		Chrysophyceae
		Xanthophyceae
	Ustarokontonhuta	Eustigmatophyceae
	Heterokontophyta	Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
	Haptophyta	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
		Prasinophyceae
		Chlorophyceae
		Ulvophyceae
		Cladophorophyceae
	Chlorophyta	Bryopsidophyceae
		Zygnematophyceae
		Trentepohliophyceae
		Klebsormidiophyceae
		Charophyceae
		Dasycladophyceae

Tabela 2.3. Classificação de algas por Barsanti e Gualtieri (2006)

2.4.2 Nutrição

A maioria das algas utiliza luz solar e carbono inorgânico para crescer. No entanto, muitas espécies apresentam uma grande versatilidade de estratégias nutricionais que vão desde a fotoautotrofia até a heterotrofia. Além disso, na maioria das divisões existem espécies heterotróficas que incorporam carbono orgânico por fagocitoses de células e por osmose de substâncias dissolvidas. Também existem muitas espécies que incorporam nutrientes do meio, como vitaminas do complexo B₁₂, ácidos graxos, e são definidas como autótrofas (Barsanti e Gualtieri, 2006). Scott *et al.* (2010) classificaram as microalgas em três grupos principais:

- Heterotróficas: carbono e energia de moléculas orgânicas (incorporadas por fagocitoses de células e por osmose de substâncias dissolvidas).

- Fototróficas: energia solar
- Mixotróficas: desenvolvem-se como fotótrofos ou heterótrofos.

2.4.3 Incorporação de carbono inorgânico

Quando o CO₂ difunde na água, forma diferentes intermediários:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3^- \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow 2H^+ + CO_3^{2^-}$$

A concentração de cada um desses na solução depende do pH e da temperatura, conforme representado na Figura 2.5. Assim, a forma de carbono inorgânico majoritária na água do mar (pH 8, a temperatura ambiente) é o íon bicarbonato (HCO₃⁻).

Muitas algas desenvolveram mecanismos concentradores de carbono inorgânico nas proximidades das células e da rubisco às expensas de gasto energético, conforme Figura 2.6, devido à pouca eficiência carboxilásica da rubisco (Giordano *et al.*, 2005). Tais mecanismos poderiam estar baseadas no metabolismo C₄, no transporte ativo de HCO_3^- e CO₂ no interior da célula (Giordano *et al.*, 2005; Mouzami-Gourdarzy e Colman, 2012), na presença de carboxilases externas (CA_{ext}) para facilitar a conversão de HCO_3^- a CO₂ (Giordano *et al.*, 2005; Bhatti *et al.*, 2008), ou compartimentos intracelulares ácidos no qual haveria presença de carboxilases ao lado do sítio da rubisco (Giordano *et al.*, 2005).



Figura 2.6. Fração molar das espécies de carbono inorgânico em água em função de pH para uma temperatura fixa. Fonte: Jacob (1999).



Figura 2.7. Transporte de carbono inorgânico através da membrana plasmática e de cloroplasto em algas eucariotas marinhas. Fonte: Giordano *et al.* (2005).

2.5 Lipídios

Geralmente, os lipídios são definidos como um grupo de moléculas naturais solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, álcoois, hidrocarbonetos e benzeno, tais como: ácidos graxos e derivados, carotenoides, terpenos, esteroides, e ácidos biliares (AOCS, 2012). Embora tal definição não seja amplamente aceita, é útil para descrever o extrato celular obtido pela ação de misturas de clorofórmio e metanol empregadas na técnica de Blight e Dyer (1959) e a suas derivadas, muito utilizadas na escala laboratorial (Greenwell *et al.*, 2010). A principal crítica dos especialistas que não

aceitam essa definição é que inclui moléculas de funções e estruturas químicas diferentes, solúveis em solventes orgânicos e em água (AOCS, 2012). Além disso, embora a extração com solventes seja muito utilizada, como não existe um consenso geral sobre a técnica de extração a empregar, é difícil estabelecer comparações das composições de lipídios na biomassa de algas (Greenwell *et al.*, 2010).

Comumente, o extracto lipídico de microalga contêm menor proporção de triacilgliceróis (TAGs) do que nos vegetais oleaginosos e podem exibir hidrocarbonetos terpenoides, como β -caroteno e licopenos; outros carotenoides oxigenados como fucoxantina, astaxantina; clorofila a; e lipídios polares como fosfolipídios e glicolipidios. Tal extrato possui aproximadamente 20% menos energia do que o petróleo cru (Chisti, 2012).

Os TAGs são moléculas de três ácidos graxos esterificados numa molécula de glicerol, geralmente aparecem no citosol na forma de grânulos e a principal função é de reserva energética (Hu *et al.*, 2008). Reporta-se que os TAGs são compostos principalmente de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Goldberg e Coehn, 2010) e que uma exceção conhecida é *Parietochloris incisa* que acumula cerca de 60% de ARA ∞ 6 no TAG (na posição sn-2) (Goldberg e Coehn, 2010). A maioria dos PUFAs das microalgas é parte da membrana, e se encontram na posição sn-2 do glicerol (Rubio- Rodriguez *et al.*, 2012; Davos *et al.*, 2012). No entanto, é difícil estabelecer uma regra geral porque as análises de ácidos graxos de microalgas são feitas com base no extrato total de lipídios (Goldberg e Coehn, 2010).

As membranas da maioria das microalgas conhecidas está formada por glicerolipidios polares. Estas moléculas são compostas por dois ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol 3-fosfato (posições sn-1 e sn-2). Por sua vez, o grupo fosfato (posição sn-3) pode ser substituído, formando diversas classes de glicerolipidios (Siegenthaler e Murata, 1998). Os lipídios encontram-se desigualmente distribuídos entre as membranas celulares, por exemplo, a membrana plasmática contém principalmente fosfolipídios (principalmente fosfatidil-colina e fosfatidil-etanolamina) (Figura 2.8), seguidos de esteróis e esfingolipídios. As membranas dos cloroplastos são ricas em galactolipídios e, em menor proporção, sulfolipidios e fosfolipídios. Além disso, frequentemente encontram-se algas com lipídios específicos, por exemplo, unidos a betaina e sulfolipidios clorados (Siegenthaler e Murata, 1998).



Figura 2.8. Fosfatidilcolina, glicerolípidios majoritário da membrana plasmática. Adaptado de Siegenthaler e Murata (1998)

2.5.1 Síntese de glicerolípidos de microalgas

As vias de síntese de ácidos graxos de microalgas foram estabelecidas por análises in silico do genoma de Chlamydomonas rehinhardii (alga verde) e corroboradas em análises posteriores em outras espécies (bibliotecas de cDNA de Galdieria sulphuraria, e de Cyanidioschyzon merolae) (Chi et al., 2008; Goldberg et al., 2010; Riekhof et al., 2009). Os ácidos graxos da maioria das microalgas formam parte dos TAGs ou das membranas celulares. Existem duas rotas de síntese de ácidos graxos principais, descritas em microalgas denominadas "síntese de novo" e de "reciclagem" (Greenwell et al., 2010). A ativação de cada uma se encontra relacionada com o estado metabólico da célula, i.e., na fase de crescimento se sintetizam ácidos graxos via síntese de novo destinados principalmente às membranas, as quais podem representar entre 5 e 20% da biomassa seca. Em condições de estresse celular, cessa a replicação e se ativam vias de síntese de novo e de reciclagem dos lipídios de membranas, pelas quais o carbono e a energia se armazenam na forma de TAGs (geralmente entre 20 e 50% da massa seca de microalga) (Hu et al., 2008). Existem espécies que sintetizam outras moléculas de armazenagemde carbono e energia, por exemplo Botryococcus braunii, uma microalga de água doce, acumula até 80% de hidrocarbonetos (cadeias de 23 a 40 carbonos) na biomassa (Hu et al., 2008).

Os encarregados da síntese *de novo* de ácidos graxos nas microalgas são dois complexos enzimáticos conservados na evolução: o acetil-CoA carboxilase (ACCasa), e o ácido graxo sintase (FAS)n(Goldberg *et al.*, 2010; Riekhof, 2009). O complexo ACCasa forma malonil-CoA a partir de acetil-CoA e CO₂ numa reação dependente de ATP (Nelson, 2001). As moléculas de malonil-CoA e Acetil-CoA se unem covalentemente ao complexo FAS para formar cadeias de ácido palmítico (16:0).

A síntese dos glicerolipidios ocorre também no retículo endoplasmático liso a partir dos ácidos graxos. A primeira etapa é a formação de fosfolipídios por esterificação das posições sn-1 e sn-2 do glicerol 3-fosfato. O fosfato da posição sn-3 pode ser substituído por outro ácido graxo para síntese de TAG, ou por uma galactose para síntese de galactolipidio (Riekhof, 2009; Siegenthaler e Murata, 1998).

Desaturação e elongação das cadeias de 16 e 18C

No cloroplasto são desaturadas cadeias de 16 e 18C. Cadeias mais cumpridas são processadas no retículo endoplasmático (Figura 2. 9).



Figura 2.9. Desaturação e elongação dos ácidos graxos de 16 e 18 C. Vias metabólicas construídas por análise e comparação *in silico* (BLAST) do genoma de 7 espécies de microalgas eucariotas fotossintéticas com a planta superior *Arabidopsis thaliana*. Fonte: Chi *et al.* (2008)

A desaturação da cadeia de ácido graxo consiste na conversão da ligação simples (saturado) C-C em ligação dupla (insaturado) por desaturases (Figura 2.13). Tais enzimas introduzem ligações duplas de forma específica e sequencial (Los e Murata, 1998). Há três tipos de desaturases conhecidas, que se classificam segundo o tipo de ligante do ácido graxo que catalisam: Coenzima A (acil-CoA desaturase); proteína transportadora de grupos acilo (acil- ACP desaturase); e glicerolipídio (acil-lipidio desaturase).

A elongação dos ácidos graxos de cadeias mais compridas é catalisada por um complexo de três enzimas presentes no retículo endoplasmático e na mitocôndria: uma condensadora (elongase), que catalisa a etapa limitante, uma redutase, e uma desidratase. Tem-se caracterizado menos genes de elongases que de desaturases (Leonard *et al.*, 2004).

2.6 Cultivo de microalgas

Há mais de mil anos que o homem utiliza microalgas na alimentação. No México, nos países da Ásia e no centro-leste da África, eram aproveitados os *blooms* sazonais de cianobactérias como *Spirulina*, *Nostoc* e *Aphanizomenon* nos ambientes naturais. As culturas artificiais - segundo Chen *et al.* (2009), a "domesticação" das culturas - começaram a partir de 1950 e foram destinadas à produção de alimento nutritivo e, posteriormente, metabólitos específicos. Alguns exemplos de cultivos em grande escala são de: *Chlorella sp.* a partir de 1960; *Spirulina platensis* no México entre 1980 e 1995; e *Dunalliela salina* a partir do 1980 (β- carotenos e astaxantina) (Chen *et al.*, 2009; FAO, 2009; Spolaore *et al.*, 2006). Há décadas que são utilizados cultivos de microalgas em tanques abertos com fins comerciais na Austrália, no Oriente Médio e no sudeste asiático

As microalgas começaram a ser estudadas como fonte de energia após da crise do petróleo em 1970. Nessa época, não foi possível obter biodiesel de microalgas devido a limitações técnicas e custos de produção. No entanto, o Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL) e outras instituições dos EUA desenvolveram o programa de pesquisa mais importante dedicado ao estudo de algas para a geração de energia: o *DOE-supported Aquátic Species Program*, entre 1978 e 1996 (Hu *et al.*, 2008). Isolaram-se milhares de espécies de microalgas das costas do Hawai e EUA, sendo selecionadas 300 após análises da composição bioquímica, genética e tolerância às condições adversas ao crescimento (Chen *et al.*, 2009).

As microalgas poderiam ser cultivadas sob os regimes de fotoautotrofia, heterotrofia e mixotrofia, e também alternando o tipo de reator empregado (por exemplo reator fechado para crescimento e aberto para acúmulo de lipídios) (Carvalho *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2008). No entanto, isso poderia não ser viável por causa da contaminação (Chisti, 2013). A produção comercial de algas limita-se a produtos de alto valor agregado (custo alto, densidade celular baixa) destinados principalmente à alimentação humana e animal, como β-carotenos, astaxantinas, EPA, ARA, DHA (Greenwell *et al.*, 2009). Esses cultivos são feitos em lagoas naturais e sistemas abertos artificiais, ou em reatores fechados heterotróficos (Chen *et al.*, 2009). A maior produção volumétrica é das espécies *Chlorella sp.*, *Arthospira sp.* (ou *Spirulina sp.*), *Dunaniella salina* e *Haematococcus pluvialis* (Greenwell *et al.*, 2009). A maior
produção reportada de microalgas é de *D. salina* a qual ocupa mais de 700 ha, e encontra-se em lago salino na Austrália (Hutt Lagoon) (Figura 2.10) (Borowitzka, 2009).

Os principais parâmetros envolvidos no cultivo fotoautotrófico são: a fonte e concentração de carbono inorgânico, fonte de água, nutrientes, areação, controle da relação CO_2/O_2 , temperatura, intensidade de luz e salinidade. Os nutrientes necessários são macronutrientes (nitrogênio, fósforo, silício para diatomáceas), traços de minerais e vitaminas. Os macronutrientes para a produção de biomassa podem ser estimados pela fórmula empírica $CO_{0.48}$ H_{1.83} N_{0.11} P_{0.01} (Chisti, 2007; Lourenço, 2006).



Figura 2.10. Produção de *D. salina* (700 ha de lago salino). Fonte: Borowitzka (2009)

2.6.1 Estimulação metabólica

A estimulação metabólica pode ser feita através da engenharia bioquímica ou genética (Courchesney *et al.*, 2009). As rotas bioquímicas de uma célula podem ser manipuladas através da indução de estresse celular com estímulos físico-químicos (Courchesney *et al.*, 2009; Chisti *et al.*, 2013). Foi reportada a indução de estresse em culturas de microalgas por: deficiência de nutrientes, baixa temperatura, alta irradiância, e câmbios na salinidade e osmolaridade na produção de biocombustíveis, de LC- PUFA (Chauton *et al.*, 2013; Courchesney *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2008) e de carotenoides (Campenni *et al.* 2013; Jalal *et al.*, 2013), entre outros.

Em vários trabalhos foi induzido estresse por deficiência ou depleção de nitrogênio, fósforo, silicato, sulfato em diferentes microalgas (Guiéneuf et al., 2013). Em geral, pode se dizer que o estresse induzido por deficiência de nitrogênio provocou a redução do conteúdo proteico, o aumento de lipídios, e/ou de carboidratos, com detrimento da produção de biomassa (Greenwell et al., 2010; Chagas 2010; Kim et al., 2014; Ho et al., 2013). Além disso, Pancha et al., (2014) observaram aumento de TAG e redução de glicolipidios e fosfolipídios em Scenedesmus obliquos. Tal observação coincide com o aumento de ácidos graxos saturados (16:0 e 18:0) e monoinsaturados (16:1 e 18:1) reportada como resposta a estresse de nitrogênio em uma microalga (Ho et al., 2013) porque a fração majoritária desses acidos graxos pertence aos TAGs, (embora. Não entanto, existem espécies que apresentam altas percentagens de LC-PUFA no TAG (Guiéneuf e Stengel, 2013). O estresse produzido por nitrogênio também impactou negativamente no conteúdo de clorofilas, de carotenoides e de prolina (Pancha et al, 2014). Essa ultima molécula é sintetizada por plantas frente a estresse salino e osmótico, e o decréscimo estaria associado ao aumento de lipídios neutros devido a uma possível função desses na manutenção da osmolaridade celular (Pancha et al., 2014). Tais autores também reportaram câmbios morfológicos na microalga estudada como redução da largura e aumento de tamanho, entre outros.

Campenni *et al.* (2013) observaram que sob deficiência de nitrogênio as culturas continuaram crescendo devido ao consumo de clorofilas, componentes da parede celular, ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas conformadas por nitrogênio. Quando nos cultivos estressados por deficiência de nitrogênio foi adicionado fósforo, aumentou o acumulo de moléculas de reserva em duas microalgas verdes. Pelo contrario, o estresse induzido por deficiência de fósforo não alterou o acúmulo de tais moléculas em tais microalgas (Chu *et al.*, 2014). Enquanto o estresse por nitrogênio afeta a síntese proteica e detém o ciclo celular na fase inicial, a deficiência de fósforo impede a divisão devido que para o ciclo na fase G_2 ou M, por tanto se esperam composições químicas diferentes (Chauton *et al.*, 2013).

Campenni *et al.*, (2013) aplicaram estresse induzido por deficiência de nitrogênio em combinação com diferente luminosidade e salinidade (10, 20 e 30g-L) do meio em *Chlorella prothoteicoides*, eles observaram que o estresse nutricional teve maior impacto no acumulo de lipídios do que a luminosidade aplicada -já que essa não alterou tal acumulo-. Alem disso encontraram maior acumulo de lipídios nas culturas estressadas com nitrogênio e crescidas com salinidade de 20g/L. O cambio de salinidade e luminosidade impactaram no acumulo e composição de carotenoides, nelas comprovaram que o aumento no fluxo de fótons acelerou a carentogenesis das culturas avaliadas e decresceu o conteúdo de clorofilas (Campeni *et al.*, 2013).

O aumento da intensidade luminosa (até nível de saturação) impactou positivamente na produtividade de biomassa, na taxa de fixação de CO₂ e no acúmulo de carboidratos em Scenedesmus obliguae (Ho et al., 2012). Tal parâmetro não teve impacto no acumulo de lipídios totais, mas induziu o acumulo de acido palmítico (16:0), esteárico (18:0), e oleico (18:1) (Ho et al., 2012). Ao igual que Hu et al., (2008) os autores relataram que a influencia de luz no acumulo de lipídios é específica da espécie, por exemplo, Wahidin et al., (2013) obteve um pequeno aumento no acúmulo de lipídios nas culturas crescidas em 100 μ mol m⁻²s⁻¹, em comparação com 50 μ mol m⁻²s⁻¹. Eles também reportaram aumento na produtividade de biomassa e fotoinibição em intensidades maiores de luz. Alta luminosidade pode causar fotoinibição das culturas com desacoplamento dos fotossitemas e cessação do crescimento (Nakanishi et al. 2014). Além da intensidade luminosa, o comprimento de onda específico da luz pode ser manipulado para evitar a fotoinibição (Torkomani et al., 2010). Tais autores propuseram dispersão de comprimentos específicos para promover o crescimento fototrófico, utilizando suspensão de nanopartículas metálicas que promovem espalhamento luminoso (light scattering), que funcionam como um "espelho". O espalhamento do fluxo luminoso pode ser "sintonizado" com a escolha adequada do tamanho e da concentração das nanopartículas, evitando fotoinibição.

Culturas de microalgas também foram iluminadas com cumprimento específico de onda aplicadas através de *leds*, filtros de plástico transparente colorido, placas de acrílico luminiscente, etc. Reportou-se um pequeno aumento na produção de biomassa e aumento de clorofila a (Mohsenpour *et al.*, 2012) e de biomassa e lipídios (Atta *et al.*, 2013) em microalgas irradiadas com diferentes longitudes de onda, em comparação com luz fluorescente. Por outro lado, os cultivos densos de microalgas estão submetidos a gradiente de luz no interior do reator, no qual as células passam de alta luminosidade até escuridão no interior do reator, com uma frequência que depende da turbulência do cultivo (Xue *et al.*, 2011). Observou-se que o aumento da taxa de crescimento *Spirulina*

platensis é função de tal frequência e da intensidade de luz aplicada (Xue *et al.*, 2011). Também, alterações do fotoperíodo provocaram câmbios no acumulo de lipídios e produtividade de biomassa de *Nannochloropsis sp.* (Wahidin *et al.*, 2012).

A concentração de CO₂ no ar (0,04%) é limitante para o crescimento das microalgas (Satoh *et al.*, 2014). Varios trabalhos foram dirigidos para aclimatar ás células com ar enriquecido em CO₂ e avaliar o desempenho na produção de biomassa e lipídios. Observou-se que cada cepa de microalga apresenta taxas de absorção diferentes e um nível máximo de tolerância ao gás (Chiu *et al.*, 2013). Existem microalgas que podem crescer com mais de 20% (alta percentagem) de CO₂ no fluxo de areação, no entanto foram pouco estudadas (Satoh *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2011).

A adição desse gás na areação em baixas percentagens (de 2 a 10%) induziram o aumento de proteínas, pequeno descenso de carboidratos, com lipídios na biomassa seca constantes tanto em *I. galbana* (Picardo *et al.*, 2013a; Bhatti *et al.*, 2005) como em *Chaetoceros cf. wighamii* (Araujo e Garcia, 2005). A produtividade de biomassa e de lipídios dependerá da percentagem de CO₂ aplicada (Nakanishi *et al.*, 2014; Chiu *et al*, 2008). O efeito do CO₂ na areação dependerá da percentagem incorporada pelas células e a dissolvida no meio de cultura (Chiu *et al.*, 2008).

Tang *et al.*, (2011) avaliaram uma microalga –*Scenedesmus obliquos*- capaz de crescer com 5 e 50% de CO_2 adicionado e obtiveram os melhores crescimentos com 5 e 10%. O aumento de 0,003% até 50% levou ao aumento do carbono inorgânico dissolvido (DIC). Tal aumento levou a redução de pH, a qual chegou a 5 unidades com 20 e 30%. Segundo os autores, tal descenso pode levar a inativação da enzima anidrase carbônica extracelular e cessação do crescimento. Guiéneuf e Stengel, (2013) demonstraram que o HCO_3^- adicionado ao meio sinergizou com o estresse por deficiência de nitrogênio na produção de TAG, e consequentemente no acumulo de EPA e DHA devido que a alga estudada (*Pavlova lutheri*) acumula PUFA nesse tipo de lipídio.

A variação de temperatura apresenta evidências de impacto na composição de ácidos graxos. Geralmente, a redução de temperatura está associada ao aumento de PUFA (Hu *et al.*, 2008; Los e Murata, 2004). Por outro lado, o aumento de temperatura foi associado ao aumento de lipídios na biomassa em algumas espécies (Hu *et al.*, 2008).

Segundo Satoh et al., (2014) vários estudos demonstraram que a qualidade e intensidade de luz, o estresse por temperatura e salino impactaram na fotossíntese, como na relação entre os centros de reação (PSI e PSII), capacidade de transporte de elétrons entre eles, atividade do transporte cíclico de elétrons em cianobacterias e micoralgas verdes. Los e Murata (2004) reportaram que tanto o estresse salino quanto o osmótico (por adição de glicerol) e o decréscimo de temperatura provocaram o aumento do teor de PUFA nas membranas celulares. Especificamente, a redução de fluidez da membrana do cloroplasto provoca dissociação do fotossistema PSII, redução do teor de clorofilas e glicerolipidios do cloroplasto (Siegenthaler e Murata, 1998). Los e Murata (2004) investigaram a capacidade das membranas de atuar em resposta as variações do meio externo. Tal variação atuaria diretamente na eletrostática das proteínas imersas na membrana ou, indiretamente, através de alteração da fluidez da biocamada lipídica (relacionada ao grau de desordem molecular e movimento das moléculas através da bicamada). Exemplos de proteínas alteradas por variações na fluidez são: canais iônicos, translocadores de moléculas pequenas, e receptores associados às proteínas quinases (Los e Murata, 2004). Devido às distintas naturezas dos estímulos fisicoquimicos, propõem-se a existência de proteínas sensores de rigidez da membrana, que iniciariam a resposta celular de aumento do número de instaurações das cadeias dos ácidos graxos (Los e Murata, 2004).

Outros autores reportaram o aumento de PUFA em cultivos de microalgas irradiados com UV, presumivelmente como resposta contra estresse oxidativo (Liang *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2007). Guiéneuf *et al.*, (2010) reportou que existem espécies sensíveis a radiação UV-R e que tal é conhecida por interferir com a absorção de nutrientes inorgânicos.

Eletroestimulação

Adey (1993) observa que a vida se desenvolveu em um "mar de campos eletromagnéticos (EM)" e que, ao longo dos séculos, o ambiente natural tem se modificado drasticamente por um crescente (e vasto) espectro de campos EM introduzido pelo homem. Ainda segundo Adey (1993), estes efeitos foram inicialmente considerados muito fracos para interagir com sistemas biomoleculares e, portanto, influenciar funções fisiológicas; baseavam-se, para esta conclusão, em modelos de equilíbrio termodinâmico e efeitos térmicos. Estudos em laboratório com diversos campos EM em níveis atérmicos para avaliar bioefeitos a níveis celular e molecular concluíram por efeitos moduladores de eventos químicos na superfície celular (Adey, 1993). Os eventos iniciados pela estimulação, inicialmente fracos, são amplificados pela ligação de hormônios, anticorpos e neurotransmissores aos seus sítios ligantes específicos. Adey (1993) destaca o papel de íons de cálcio nesta amplificação e da comunicação entre as células através das membranas, apontando para uma organização celular complexa – comparada à definida pela estrutura química molecular, mediada por processos altamente não lineares e de não-equilíbrio.

Campos eletromagnéticos foram empregados para inativação microbiana no século XIX (Berg, 1995). Na década dos 60, observou-se que os campos de alta intensidade (acima dos 100kV/m) alteram as propriedades dielétricas das membranas biológicas devido à formação de poros transientes ou quebra da bicamada lipídica. Atualmente, utilizam-se campos de alta intensidade como ferramenta de transformação genética através da formação de poros transientes (Berg, 1995).

A aplicação de campos elétricos em processos de fermentação começou ser reportada nos últimos 30 anos. Campos elétricos de baixa intensidade (menos de 10mV/cm) foram utilizados para estimulação metabólica como procedimento de análise de processos em reatores (por exemplo, viabilidade celular) (Costello, 2012). Yaoita *et al.* (1989) reportaram que campos elétricos de baixa intensidade eram capazes de alterar o metabolismo e a morfologia de células eucariotas (células HeLa). A utilização de campos elétricos como ferramenta de estimulação evita a adição de produtos químicos, que poderiam aumentar a etapa de tratamento de separação do produto e de resíduos (Costello, 2012). Cho *et al.* (2009) descrevem a aplicação de campos elétricos de intensidade média (entre 1 e 20V/cm) na indústria alimentícia como alternativa à pasteurização térmica ("aquecimento ôhmico").

Existem varias configurações experimentais para aplicar estímulos eletromagnéticos. Basicamente, diferem-se no tipo de campo eletromagnético (puramente elétrico, magnético ou ondas eletromagnéticas), duração do estimulo, frequência, distância à fonte, intensidade e forma da onda aplicada (Hunt *et al.*, 2009). Segundo Velizarov (1999) e Berg (1991), existem 4 técnicas principais:

1- Corrente contínua ou alternada através de eletrodos inertes (platina, prata, carvão, aço inox) imersos no meio de cultura, células ou tecidos. Podem surgir efeitos

secundários de eletrólise para frequências inferiores a 1000 Hz, intensidades de campo elétrico inferiores a 25 V cm⁻¹ e densidades de corrente inferior a 0.25 mA cm^{-2} .

2- Campo magnético estático concentrado nos polos de um material magnético ou eletroímã.

3- Acoplamento capacitivo de campos eletromagnéticos aplicados do lado do meio de cultura, e.g., ondas senoidais aplicadas com eletrodos protegidos com material dielétrico, para frequências inferiores a 100 Hz, intensidades de campo elétrico inferiores 100 mV cm⁻¹ e densidades de corrente inferiores a 1 mA cm⁻².

4- Acoplamento indutivo de campos eletromagnéticos aplicados via bobinas de Helmoltz ou solenoides para frequências inferiores a 100 Hz, intensidades de campo elétrico inferiores 10 mV cm⁻¹, densidades de corrente inferiores a 1 mA cm⁻² e intensidades de campo eletromagnético inferiores a 10 mT, às vezes compensado com fluxos estáticos para contrapor o campo geomagnético.

Berg (1991) e Velizarov (1999) observaram que os três tipos de intensidade aplicada (alta, média e baixa) induzem polarização da membrana e de outros biopolímeros, assim como deslocamento de íons e aumento da permeabilidade celular. A permeabilidade da membrana aumenta por mecanismos diferentes: enquanto os campos de alta intensidade induzem à formação de poros (eletropermeação), deformação e quebra da membrana, os de baixa intensidade estimulam a passagem de íons através dos canais proteicos.

Quando se aplica um campo elétrico a uma célula os íons se reacomodam na superfície interna e externa alterando as propriedades elétricas dos meios separados pela mesma, e se induz uma queda do potencial transmembrana, o qual pode ser aproximado pela equação de Laplace (Eq. 2.1). Com campos de baixa intensidade, a membrana atua como um dielétrico; portanto, a acumulação de carga da membrana pode se descrever como um capacitor e a célula pode ser modelada como uma esfera dielétrica perfeita (Figura 2.11).

$$\psi_i = f r g(\lambda) E \cos\theta \left(1 - e^{-t/\tau_{carga}} \right)$$

Equação de Laplace (Eq. 2.1). Potencial transmembrana (Ψ i) induzido por campo elétrico (E). r: radio da vesícula, t: tempo transcorrido imediatamente depois de aplicado o pulso; f: constante que depende do radio e das condutividades; τ constante de carga do capacitor.





Markx *et al.* (1999) propuseram outros modelos de células mais reais, que consistem em capas elipsoidais de dielétricos (as cargas não migram, no entanto, materiais polares podem reorientar dipolos em direção ao campo), e condutoras (as cargas migram) com acumulação diferencial de cargas nas interfases. Por exemplo, a superfície celular, membrana plasmática e o citoplasma poderiam ser modelados como capas com condutividade e dielétrico homogêneas (Markx *et al.*, 1999). Hunt *et al.* (2009) propuseram outros modelos para explicar a interação dos campos eletromagnéticos com as células. Os campos de baixa intensidade poderiam interferir diretamente com as moléculas como proteínas e/ou seus ligantes, e ácidos nucleicos (por eletrostática ou provocando mudanças conformacionais), afetando as uniões moleculares. Hunt *et al.*, (2009) observaram a interferência dos campos eletromagnéticos com o meio extracelular como íons e momento dipolar da água. McLaughin *et al.*(1981) reportaram a eletroforese de moléculas através da bicamada

lipídica por interação do campo elétrico com cargas e momentos dipolares de tais moléculas, tal como se esquematiza na Figura 2.12.



Figura 2.12. Interação de campo elétrico (U) com proteínas, açúcares e lipídios das membranas. O campo induze a migração anódica (+) ou catódica (-) das moléculas com carga na membrana. Fonte: McLaughin *et al.* (1981)

Chen *et al.* (1998) concluíram que o estresse fisiológico induzido por campo elétrico de alta intensidade seria promovido principalmente a nível da membrana plasmática por interação com a bicamada lipídica ou com as proteínas imersas nela. Os autores propuseram que o dano na membrana plasmática é mais severo do que em outras organelas devido à maior resistência elétrica da bicamada lipídica do que a do fluido citoplasmático e extracelular (entre 6 e 8 ordens de grandeza). Quando se aplicam campos elétricos, induz-se a queda do potencial transmembrana e, como a espessura da bicamada é ordens de grandeza inferior à da célula, a pressão induzida pela força do campo elétrico é centenas de vezes maior do que a força aparente (Chen *et al.* 1998).

As primeiras observações de interferência de campos elétricos em suspensões de células foram através de medidas de condutância do meio. Observou-se que a condutância, uma propriedade macroscópica que mede a passagem de íons, aumentava bruscamente após um valor crítico de intensidade (geralmente superior a 100V/m). Esse

aumento foi explicado com a quebra do dielétrico das células. Observou-se que a membrana plasmática funcionava como dielétrico, o qual, após a aplicação do campo, formava poros ou se quebrava e induziam a lise celular (processo de ruptura ou dissolução da membrana plasmática ou da parede celular, que leva à morte da célula e à liberação de seu conteúdo).

Quando são aplicados campos de frequência baixa (<100Hz) ou nula (DC) a resposta elétrica da solução pode ser aproximada modelando-se cada célula como uma esfera dielétrica perfeita. A condutância total pode ser modelada como a soma de cada condutância individual (Roth, 1997). O circuito elétrico equivalente de uma célula ou uma suspensão dessas sob campos elétricos pode ser representado como um capacitor em série com uma resistência (Ri), ambos em paralelo com outra resistência (Re). Na Figura 2.13, Re corresponde à resistência do meio extracelular, e Ri à do meio intracelular. A capacitância esta dada pela membrana plasmática (Roth 1997). Tal circuito pode ser empregado para medir a concentração celular, já que a corrente decresce com o aumento celular (Cho *et al.* 1996).



Figura 2.13. Reator com células e circuito equivalente, considerando cada célula como uma esfera dielétrica perfeita. Fonte: Roth (1997)

Aplicação de campos elétricos em fermentação

A Tabela 2.4 reúne investigações que reportam uma relação entre respostas celulares ou/e o ciclo de vida da cultura sob eletroestimulação.

Microrg./Ref.	Campo elétrico	Eletrodos	Resposta
Saccharomyces	Voltamogramas com	Platina, grafito	As culturas em fase
cerevisiae	varredura de 0 a 1Vsce	e calomelano	exponencial apresentaram
		(eletrodo de	um pico de corrente em
Ci et al. (1997)		referência)	0,73Vsce.
		imersos na	
		cultura.	
S. cerevisiae	0,5; 1; e 2V	Titânio	-Redução da estabilidade do
recombinante		imersos na	plasmídio recombinante.
		cultura.	-Fermentação aeróbica:
Castro et al.			Aumento na produção de
(2011)			biomassa (sendo máxima
			com 2V); redução da fase
			<i>lag</i> de cultivo.
			-Fermentação
			microareóbica:
			Menor taxa de crescimento.
S. cerevisiae	0,75Vsce	Platina e	Alteração do ciclo celular e
		calomelano	da constante de afinidade
Araujo <i>et al</i> .		(eletrodo de	pelo substrato (Ks).
(2004; 2007)		referência),	-Variação na taxa de
		imersos na	crescimento e do consumo
		cultura.	de substrato.
			-Aumento do número de
			cicatrizes por célula
			(indicando aceleração do
			ciclo celular)
Yarrowia	0,70Vsce	Platina e	-Aumento do consumo do
lipolítica		calomelano	substrato.
		(eletrodo de	-Redução da taxa de
Oliveira et al.		referencia),	crescimento
(2010)		imersos na	-Aumento de produtividade
		cultura.	de lípase.
			-Sem influência na
			morfologia, nem na
			viabilidade celular.
Lactobacillus	15V; 40V, 60Hz, duas	Aço inox	-Redução da fase <i>lag</i>
Acidophilus	temperaturas	cobertos com	-Inibição do crescimento na
		isolante	fase tardia em condições de
Cho <i>et al</i> .		elétrico,	temperatura não ótima
(1995)		imersos na	
		cultura.	
Lactobacillus	-1 V/cm durante todo o	Platina	-Sem influência na fase <i>lag</i>
Acidophilus	cultivo em batelada e	titanizados,	nem na taxa de crescimento
	-1 V/cm, 60 Hz em	imersos na	observada.
Loghavy et al.	diferentes etapas do	cultura.	-Aumento atividade da
(2007)	crescimento		proteína bactericina.

Tabela 2.4. Exemplos de aplicações de campos elétricos em processos fermentativos

Lactobacillus	- 0V, 30 e 37°C		-Ondas senoidais puras a 45
acidophilus	-1V/cm (45, 60 e 90 Hz)		e 60 Hz provocaram a
	30°C		redução da fase <i>lag</i> .
Loghavy et al.	- 45, 60 e 90Hz 30°C		
(2009)			-Maior produção de
	-45, 60 e 90Hz: Ondas		bactericina a 60 Hz com
	senoidais puras		harmônicas quando foram
	60Hz: Ondas harmônicas		aplicadas só nas primeiras
	direto da rede elétrica		horas de cultivo.
Lactobacillus	1 V/cm, 45 e 60 Hz	Platina	Sem diferença com o
bulgaricus		titanizados,	controle (0V) nos
_		imersos na	parâmetros de crescimento
Costello		cultura.	
(2012)			
Streptococcus	1 V/cm, 45 e 60 Hz	Platina	Redução da fase <i>lag</i> com
thermophilus		titanizados,	45Hz
-		imersos na	
Costello		cultura.	
(2012)			
S. cerevisiae	Indução de eletrolises do	Platina,	Variação na taxa de
	meio com correntes entre	imersos na	crescimento
Nakanishi, K.	10 e 100 mA, DC e AC	cultura	Aumento da produção de
et al. (1998)			etanol
1	1	1	1

Uma possível explicação da interferência do potencial elétrico nos processos metabólicos seriam as reações eletroquímicas como redox ou síntese de ATP (Ci *et al.* 1997; Hunt *et al.*, 2009). Por exemplo, Ci *et al.* (1997) aplicaram voltametrias em culturas de *Sacaromyces cerevisieae* e observaram um pico de corrente (0,73Vsce) nas células em etapa de crescimento exponencial, enquanto não o observaram nas culturas senescentes. Feng *et al.* (1997) encontraram uma relação linear entre o pico de corrente em O,7 Vsce e o número de células em fase de crescimento. Também identificaram uma relação entre o estado fisiológico das células e a resposta eletroquímica.

Araujo *et al.* (2004; 2007) aplicaram potencial elétrico em cultura de *S. cerevisiae* e observaram variações no ciclo de vida, no número de cicatrizes por célula e na taxa de consumo de substrato, concluindo que o potencial facilitou o transporte de glicose para o interior da célula sem aumento da produção de etanol. Tal potencial também alterou a taxa de crescimento e a produtividade de uma lipase extracelular de *Yarrowia lipolitica* (Oliveira *et al.*, 2007).

Há relato da existência de janelas de intensidade e frequência nas quais o campo elétrico pode estimular ou inibir os processos de fermentação (Berg, 1995), com indução de uma resposta fisiológica por campos elétricos dependendo das condições experimentais. Segundo Berg (1991), os parâmetros não controlados são responsáveis pela diferença entre resultados reportados. Por exemplo, no trabalho de Castro *et al.* (2011) observaram uma dependência da estimulação com a disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo: o crescimento de *S. cerevisiae* foi estimulado em cultivos aeróbicos e inibida em condições de microaerobiose (em comparação com o controle de 0V feito para ambas as condições). O fenômeno se explicaria com uma melhor absorção do substrato em aerobiose, e uma sinergia negativa dos estresses induzidos pela falta de oxigênio e pelo campo elétrico.

Cho *et al.* (1996), Loghavy *et al.* (2007) e Costello (2012) também reportaram diferenças na resposta à eletroestimulação com relação às condições experimentais. Enquanto Cho *et al.* (1996) observaram redução da fase *lag* em *Lactobacillus acidophilus*, Loghavy (2007) não obteve os mesmos resultados com o mesmo campo e outras condições experimentais. Costello (2012) aplicou dois níveis de temperatura e dois campos elétricos de frequências diferentes em *L. bulgaricus e Streptococcus thermofilus* e observou variação nos parâmetros de crescimento unicamente em uma espécie e em uma condição de temperatura e de frequência.

Aplicações de campos eletromagnéticos em cultivos de microalgas

Experimentos com aplicação de campos eletromagnéticos em microalgas indicam interferência destes com a fotossíntese, o qual impactou de forma positiva ou negativa no crescimento em função da janela de intensidade e de frequência aplicadas (Hirano *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2012) (Tabela 2.5).

Microalga	Tipo de Campo	Aplicação	Resultado
S. platensis Li et al. (2006)	Magnético (0- 0.55T)	Cabos solenoides fora do reator (3,5L). Batelada (9d)	Efeito positivo na fase linear de crescimento. Efeito inibitório na fase estacionária. <0.4T estimulação da taxa de crescimento >0.5T inibição do crescimento na fase final. 0.25T provocou o aumento da biomassa em 47% sobre o controle no quinto dia. Variação da composição de aminoácidos e traços de minerais.
			Consumo mais rápido de N. P e CO ₂
S. platensis Hirano et al. (1998)	Magnético. Intensidade (medida no centro da cultura): - 0.5, 100, 700 Gauss (Cultivo heterotrófico) -0,5Gauss: Fluxo geomagnético	Magnetos permanentes do lado do tubo de cultura (150 mm cumprimento e 30mm de largo)	Cultura autotrófica: -Taxa de crescimento: : efeito positivo em 50-350G e efeito negativo em 400- 700G: -Conteúdo de glicose em massa seca: aumento entre 100-350 e redução em 700G. -aumento em massa seca de ficocianina em 100G e redução a 700G. -redução de glicerolipídios (constituinte majoritários da membrana tilacóide) a 700G. Aceleração da taxa de evolução de oxigênio Culturas heterotróficas: Sem influência no crescimento.
Chlorella kessleri Small et al. (2012)	Magnético	Erlenmeyer 2L 0 (control), 5, 10 e 15 mT <i>Raceway pond</i> (3,5L) 10 mT.	Erlenmeyers: Maior taxa de crescimento em 10mT Raceway: Pequeno aumento de proteínas,

 Tabela 2.5.
 Aplicação de campos eletromagnéticos em microalgas

	gerado solenoide	por	carboidrato, clorofila a e clorofila b. Aumento na concentração de Ca, Mn, Zn e Ni, e redução de Fe e Cu. Sem variação de Mg. Pequeno aumento de teor de ácidos graxos, com exceção de 18:1n7 e 15:0. Variação dos Parâmetros fotossintéticos: mudanças na ultraestrutura de grânulos
			ultraestrutura de grânulos citoplasmáticos.

2.7 Isochrysis galbana

I. galbana pertence à ordem Isochrysidaes, incluída na divisão Prymnesiophyta (Lourenço, 2006). Tal divisão tem espécies unicelulares (isoladas ou em colônias), apresentam flagelos e possuem uma estrutura conhecida como haptonema entre eles. A maioria das espécies conhecidas são fotossintéticas de ambientes marinhos e reproduzem-se por divisão binária (Lourenço, 2006). Contém cloroplastos rodeados por quatro membranas (Ishida e Green, 2001). Os pigmentos fotossintéticos caracterizados nesta divisão são clorofilas (a, c1 e c2) e carotenoides (β -carotenos, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina) (Takaichi, 2011; Obata e Taguchi, 2012). A energia é armazenada em polímeros de glicose (ligações β 1-3) nos vacúolos, e lipídios neutros em grânulos no citosol. Especificamente, *I. galbana* encontra-se isolada com forma esférica ou piriforme (forma de pera) e mede 5µm de diâmetro aproximadamente (Lourenço, 2006) (Figura 2.14).



Figura 2.14. Resumo dos aspectos gerais de *I. galbana*.: a) esquema da célula, observam-se os dois flagelos e o haptonema no meio, e o plastídio (flecha) (Ishida e Green, 2001); b e c) Fotografia de cultivos, em b) observam-se células com flagelos e inclusões mais escuras - grânulos de lipídios, e m c) observam-se as diferentes morfologias celulares presentes na fase estacionçaria; d) e e) fotografias eletrônicas de corte transversal (Liu *et al.*, 2001), obervam- se três grânulos de lipídios em (c), e o cloroplasto em (d).

Utiliza-se *I. galbana* na aquicultura porque possui ϖ 3-EPA (Adarme-Vega *et al.*, 2012). Adicionalmente, tem potenciais aplicações para a produção de SCO de ϖ 3-PUFA (Adarme-Vega *et al.*, 2012; Marchetti *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 1992), para a produção de energia (Picardo *et al.*, 2013b; Sanchez *et al.*, 2013), e para a co- produção de fucoxantina (molécula com alto valor nutricional) e lipídios (Kim *et al.*, 2012). Nuño *et al.* (2013) indicam *I galbana* como aditivo alimentar já que observaram melhorias na saúde de ratos diabéticos alimentados com a microalga (como menos acúmulo de TAG, colesterol e glicose no sangue). Fradique *et al.* (2013) reportaram que a adição de pastas de *I. galbana* em alimentos cozidos melhora as características nutricionais dos mesmos (por aumento direto de ϖ 3, antioxidante). Devos *et al.* (2006) destacou que *I. galbana* e a dinoflagelado heterotrófico *Crypthecodinium cohnii* são as únicas espécies de microalgas conhecidas capazes de produzir DHA como único ϖ 3-PUFA - entre 2 e 25% do total de ácidos graxos. Existem três cepas que foram avaliadas para tais

finalidades: Parke, T-Iso e Tk1 (Chi-Cheng *et al.*, 2010; Devos *et al.*, 2006; Molina Grima *et al.*, 1995; Alonso *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1997).

Vários trabalhos (Renaud *et al.*, 1990; Poisson e Ergan, 2001; Devos *et al.*, 2006; Molina Grima *et al.*, 1992; Tzovenis *et al.*, 2003) reportam 6 ácidos graxos preponderantes nas análises (geralmente com mais do 10% cada um) do total do extrato lipídico de *I. galbana*: mirístico (14:0); palmítico (16:0); esteárico (18:0), oléico (18:1n-9), dos quais geralmente o oléico resultou majoritário. Exceções foram reportadas por Fidalgo *et al.* (1998), que obtiveram menos de 2% de oléico do total de ácidos graxos, e por Yoshioka *et al.* (2012), que obtiveram maioria de16:0; 16:1n-7; 20:5n-3 e 22:6n-3 (cada um entre 10 e 15% do extrato lipídico). Além disso, vários autores identificaram entre 1 e 20% do total de ácidos graxos de ácido palmitoléico (16:1n-7) e esteraidónico (18:3n-4) (Renaud *et al.* 1990; Poisson e Ergan 2001; Yoshioka *et al.* 2012). Alonso *et al.* (1992) reportaram níveis de DHA (22:6n-3) no óleo de 5% e de EPA (20:5n-3) entre 10 e 15%. Yu *et al.* (2010) obtiveram percentagens muito inferiores, assim como também foram obtidos outros ω 3 e ω 6 PUFAS de 16, 18 e 20 carbonos em *I. galbana* com percentagens menores que 5% (Davos *et al.*, 2006; Renaud *et al.*, 1990; Poisson e Ergan, 2001).

Os lipídios das membranas tilacóides em T-Isso, principalmente 14:0, 16:0, 18:1n-9, 18:3n-3 e 22:6n-3, os quais também foram encontrados em grandes quantidades nos TAGs (Tzovenis *et al.*, 2003). A distribuição de ω 3 PUFA em TAG, glicolipídios e fosfolipídios de *I. galbana* apresenta maior percentagem de EPA e/ou DHA na fração dos fosfolipídios (Zhu et al., 1997; Devos *et al.*, 2006; Molina Grima *et al.*, 1994) e, segundo Devos *et al.* (2006) na posição sn-2. Tzovenis *et al.* (2003) consideram que, sob condições ótimas de crescimento, a distribuição de DHA - o produto final das vias de dessaturação de ácidos graxos - em *I. galbana* é: 15% em glicolipídios, 35% em fosfolipídios e 50% em TAGs. Adicionalmente, Tzovenis *et al.* (2003) reportam que tal ácido graxo tem um papel central na fisiologia das membranas, e que existe um intercambio desse entre o TAG e nas membranas.

A composição química de *I. galbana* dependerá da cepa, do clone isolado dentro da cepa e condições de cultivo empregadas (Alonso *et al.*, 1992; Sukenik e Wahon, 1990). De forma geral, observa-se que a irradiância aumenta a taxa de crescimento e os níveis de DHA e de ácidos graxos saturados, e reduz os níveis de lipídios (Alonso *et al.*,

2002; Marchetti *et al.*, 2012; Tzovenis *et al.*, 2003). Tzovenis *et al.* (2003) reportam diferenças na composição de ácidos graxos no extrato lipídico sob diferentes regimes de luz/escuridão (fotoperiodo), sendo o ciclo de 12/12 hs o indicado para a produção de PUFA em T-Iso. Durante o crescimento sob limitação de luz, observa-se acúmulo de 18:3n-3 e 16:1n-7 (Tzovenis *et al.* 2003). Sob condições de saturação luminosa, enquanto o 18:3n-3 permanece constante, a produção de ácidos graxos 18:3n-6 e 18:5n-5 é reduzida, e 22:6n-3 e 20:5n-3 aumentada, indicando uma provável mobilização de sates, dos TAGs para as membranas tilacóides seguida de dessaturação e elongação de cadeia (Tzovenis *et al.*, 2003). Qi et al., (2002) caracterizaram a dessaturação e elongação de síntese apresentada na Figura 2.15.

Figura 2.15. Possível via de desaturação e elongação de @-3 em I. galbana Adatado: Qi et al,. (2002)

Sukenik e Wahnon (1990) observaram redução na concentração de clorofilas a e c em *I. galbana* cultivadas sob deficiência de nitrogênio e com alta intensidade luminosa. Fidalgo *et al.* (1998) observaram que os teores de carotenoides e clorofilas reduziram-se quando as células entraram em fase estacionária. Em células sob estresse de nitrogênio e fósforo, Mendieta (2013) observou o contrário, i.e., um aumento na concentração de carotenoides de *I. galbana* na fase estacionária em relação ao crescimento em condições menos estressantes de tais nutrientes, provavelmente como mecanismo de resposta contra radicais livres. Jalal *et al.*, (2013) também reportou auemnto de carotenoides na fase estacionaria de culturas estressadas por deficiencia de N. Observa-se, também, que a deficiência de nitrogênio e alta irradiância também aumentam a percentagem de lipídios na biomassa, sugerindo ativação das vias de reciclagem de N e síntese de moléculas de armazenamento de carbono e energia; e que a relação entre nitrogênio e fósforo altera o acúmulo de pigmentos e as percentagens de lipídios, carboidratos e proteínas nas fases exponencial e estacionária do crescimento (Chagas, 2010; Mendieta,

2013). Yoshioka *et al* (2013) avaliaram os efeitos de iluminação com luz branca, vermelha e azul, contínua ou intermitente, concluindo que a luz azul intermitente melhorou o crescimento e o acúmulo de lipídios, embora não tenha alterado o perfil de ácidos graxos totais na fase estacionária de cultivos em batelada da microalga (Tabela 2.8).

Cultivos com alta concentração de CO_2 na aeração aumentou a taxa de crescimento e a produtividade de biomassa, e também estimulou a síntese de proteínas, e lipídios (com pequeno aumento) (Picardo *et al.*, 2013a; Bhatti *et al.*, 2008). *I. galbana* possui uma anidrase carbônica extracelular que catalisa a conversão de HCO_3^- (espécie predominante na água do mar entre pH 6 e 9) em CO_2 (aq) facilitando a incorporação de ambas espécies de carbono na célula. Isso ocorreria quando o pH da água do mar difere do pH interno da célula (estimado em 7-7,2) (Bhatti et al., 2009), já que se observou repressão da atividade de tal enzima sob elevadas concentrações de CO_2 na areação, presumivelmente por causar redução no pH do meio, o que possibilita a difusão passiva do gás no interior da célula (Picardo *et al.*, 2013*a*) (Tabela 2.8).

Também foram reportadas diferenças no biovolume celular, como aumento na fase estacionaria de culturas em batelada (Chagas, 2010) e com o aumento da intensidade luminosa nas culturas crescidas sob regime de luz continua (Tzovenis *et al.*, 2003).

Capítulo 3- Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os métodos experimentais empregados para avaliar o impacto da aplicação de potencial elétrico em cultivo de *Isochrysis galbana* com aeração enriquecida de CO₂.

3.1 Microrganismo

Os experimentos foram realizados com *Isochrysis galbana* proveniente da Coleção de Microalgas "Elizabeth Aidar", do "Laboratório de fisiologia e Cultivo de Algas". Tal espécie pertence à ordem Isochrysidais, incluída na divisão Prymnesiophyta (Lourenço, 2006)

I. galbana foi previamente escolhida pelo grupo de trabalho após realizar um *screening* de microalgas como fonte de biomassa renovável para produção de energia e metabólitos de interesse na industria química e de alimentos (Picardo *et al.*, 2013a).

3.1.1 Aclimatação prévia

Inicialmente, *I. galbana* foi cultivada para aclimatá-la às condições experimentais e obter a biomassa para o inóculo inicial dos experimentos seguintes. No reator de 2L, realizaram-se dois cultivos em batelada com cortes sucessivos de 10 dias de duração cada um. No primeiro deles, as células foram aclimatadas ao fluxo de areação com 5% de CO_2 (2L/min). Para isso, incrementou-se a concentração de CO_2 no fluxo de ar de forma manual diariamente (pH-metro de campo PHTEK), controlando-se a injeção para que o pH não atingisse valores inferiores a 5,5. O segundo cultivo de aclimatação realizou-se com um inoculo do primeiro, e se aplicaram os parâmetros operacionais definidos para os demais experimentos. Ambos cultivos foram realizados com o meio reportado por Guillard (1975) (Tabela 3.1). Foi utilizado o meio com uma concentração de nutrientes 5 vezes superior à reportada para atingir elevada concentração celular, devido que nos experimentos de eletroestimulação foram utilizados cultivos densos (ver seção 3.2.1).

3.1.2 Inoculação

O inoculo inicial de cada experimento empregou células em fase exponencial aclimatadas à elevada percentagem de CO_2 na areação, tal como se explica na figura 3.1. Para isso, no término de cada experimento (às 9hs do período de luz do décimo dia

de cultivo), refez-se o volume inicial (2L) com água de mar artificial e meio fresco f/2 (meio com componentes concentrados 3 vezes mais aos reportados por Guillard (1975) e descritos na tabela 3.1 na seção 3.1.2), e cultivou-se por 32 hs. Após esse período, retirou-se 1L de cultivo e adicionou-se o mesmo volume de água de mar artificial e de meio fresco f/2 3x e cultivou-se por 30hs. Passado esse período, o cultivo foi transferido em capela de fluxo laminar para um *erlenmeyer* de 4L previamente autoclavado (30min, 1atm) com areação enriquecida em CO_2 por 2hs, preparado para o novo cultivo. O inoculo inicial do novo cultivo de *I. galbana* foi obtido do *erlenmeyer* de 4L.



Figura 3.1. Procedimento de inoculação das culturas de I. galbana.

3.2 Condições de cultivo

3.2.1 Meio de cultivo

Cultivou-se *I. galbana* em versão modificada do meio semidefinido f/2 Guillard (Guillard 1975) (Tabela 3.1). As modificações de tal meio foram as seguintes:

- A concentração de cada solução adicionada foi 5 vezes maior à reportada com o fim de obter culturas densas. Tal condição foi necessária para obter biomassa seca em

quantidade suficiente (80- 100mg) para realizar as análises bioquímicas, extraindo menos do 10% da cultura na amostragem da etapa exponencial de crescimento.

- Não foi adicionado silicato devido a que é um nutriente necessário apenas para a síntese da parede celular - estrutura inexistente em *I. galbana*-.

- A água de mar natural foi substituída por água de mar artificial, feita com sal marinha (Ocean Fish[®]) dissolvida em água deionizada (33g/L).

A esterilidade do meio foi mantida trabalhando-se em capela de fluxo laminar, filtrando-se a água de mar sintética e as soluções estoque em membranas de celulose de 0,22µm de porosidade (com exceção da solução de metais) e esterilizando esses materiais (com exceção da solução de vitaminas) por 30 min a 1atm na autoclave.

Soluções	Reportadas (MG/L)	Modificadas 5x (mg/L)
NaNO ₃	75	375
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	25
FeCl _{3.6} H2O	3,15	15,75
Na ₂ EDTA	4,36	21,8
CuSO4.5H2O	9,8	49
Na2MoO4.2H2O	6,3	31,5
ZnSO4.7H2O	22	110
CoCl2.6H2O	10	50
MnCl2.4H2O	180	900
Cianacobalamina (B ₁₂)	0,00025	0,00125
Tiamina	0,05	0,25
Biotina	0,00025	0,00125

Tabela 3.1. Concentração final dos componentes do meio f/2 Guillard (Guillard 1975) no meio de cultura (foram desprezados os nutrientes da água do mar sintética).

3.2.2 Fotobiorreator

I. galbana foi cultivada em reator construído previamente pela equipe do laboratório, apresentado na Figura 3.2, também utilizado por Picardo *et al.* (2013a). Tal reator é uma cuba de vidro de 2L de capacidade com aeração, temperatura e luminosidade controladas de forma automatizada. A superfície foi coberta com uma tampa de acrílico com perfurações para instalação do banho térmico, tubos de areação e

dois suporte de vidro utilizados para posicionamento dos eletrodos nos experimentos com aplicação de campo elétrico.



Figura 3.2. Fotobiorreator utilizado para cultivo de Isochrysis galbana.

3.2.3 Aeração

I. gablana foi cultivada com uma vazão de ar comprimido (2L/min) enriquecido com CO_2 . Para promover maior área interfacial gás/líquido, utilizou-se na aeração difusor de vidro com 4 saídas. A porcentagem de CO_2 empregada na aeração foi aumentada diariamente em intervalos de tempo coincidente com a metade do período de iluminação, da forma seguinte: 1,2 % no primeiro dia, 3% no segundo dia, e 5% a partir do terceiro dia de cultivo.

A vazão de ar comprimido foi controlado com um rotâmetro de gás (Moriya, 0-15 L/min). A vazão de CO_2 foi controlada por um controlador CD600 (Smar) e um controlador de vazão mássica (*mass flow controller*, Alborg, 0-200 mL/min).

3.2.4 Temperatura

A temperatura dos experimentos de cultivo de *I. galbana* foi mantida em 25 °C com um banho termostático (Quimis, Q214M2), dotado de controle automático de temperatura, utilizando água fria circulando por mangueiras de látex e tubo de aço (em forma de U) imerso na cultura.

3.2.5 Iluminação

As culturas de *I. galbana* foram iluminadas com lâmpadas fluorescentes conectadas a um temporizador analógico. A intensidade de luz foi medida como fluxo de fótons incidentes na superfície do reator com um sensor quântico (Li-Cor, Li 190)

acoplado a um integrador radiométrico (Li-Cor, Li 250A). Durante os experimentos, a intensidade de luz na superfície do reator foi fixada em 200 μ E (1 E = 1 mol de fótons/m².s) em fotoperíodos de 12h iluminação seguidas por 12h escuridão.

3.2.6 Eletroestimulação

As culturas de *I. galbana* foram eletroestimuladas com um campo elétrico constante criado por dois eletrodos de platina imersos no cultivo. Os eletrodos foram construídos com um fio de platina disposto sobre uma superfície de vidro distanciados um do outro em 4,5 cm. A Figura 3.3 ilustra o arranjo experimental, sem representar os sensores para acompanhamento *on-line* de pH, temperatura e irradiância.



Figura 3.3. Arranjo experimental simplificado, com aeração, eletrodos e potenciostato.

Com o potenciostato (PalmSens BV), conduziu-se experimento com controle de potencial (com corrente contínua), aplicando-se se uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o contraeletrodo de $0,65 \pm 0,1V$ (DC). O valor de potencial elétrico foi escolhido após a realização de análises de estabilidade eletroquímica do meio f2 Guillard sem células, areado por vazão de 2L/min de ar enriquecido com 5% de CO₂. A estabilidade eletroquímica foi avaliada por voltametrias cíclicas realizadas com o potenciostato acoplado ao sistema de acordo com esquema da Figura 3.3, e *software* de aquisição e análise de dados (PalmSens[®]). Durante a varredura de potencial no intervalo de 0 a +1V, registrou-se a corrente (mA), que decorre de reações eletroquímicas. Portanto, a ausência de picos de corrente no voltamograma pode ser interpretada como ausência de reações eletroquímicas e, portanto, como estabilidade

eletroquímica do meio f/2. A Figura 3.4 apresenta um voltamograma típico obtido nesses ensaios onde não há corrente elétrica de amplitude significativa no intervalo entre 0.4 - 0.7V. Note-se que os picos de corrente obtidos nos extremos da faixa de potencial investigada corresponde à eletrólise da água (evolução de O_2 e H_2).



Figura 3.4. Voltamograma obtido por voltametria cíclica - corrente (mA) vs. potencial (V) aplicado entre os eletrodos imersos no meio f2 Guillard (Guillard, 1975) sem células e com vazão de ar enriquecido com 5% de CO₂ (2L/ min).

3.3 Procedimento experimental

Todos os experimentos conduzidos foram cultivos em batelada de *I. galbana* com 10 dias de duração. Diariamente, foram recolhidas amostras de 3mL do cultivo para contagem celular e análise de nitrogênio. Nos dias 3, 6 e 10, foram coletados 195 mL para análise bioquímica (composição celular) e morfológica (Figura 3.5).

Para avaliar os efeitos do potencial elétrico no cultivo de *I. galbana*, foram definidos três grupos experimentais: sem aplicação de potencial elétrico ("0V"); cultivos eletroestimulados a partir do dia 0 ("0,65V D0"); e cultivos eletroestimulados a partir do dia 3 ("0,65V D3"). Nos dois últimos grupos, o potencial permaneceu constante até o final de cada cultivo (Figura 3.5)



Figura 3.5. a) Esquema de curvas de crescimento dos três grupos experimentais: controle (0,00V), e eletroestimulados desde o dia 0 e desde o dia 3, até o final do experimento (dia 10) com potencial elétrico constante de (0,65± 0,1)V. b) Dias de amostragem em função da análise realizada.

3.4 Análise e processamento da biomassa

3.4.1 Coleta e secagem

Para realizar as análises bioquímicas, que requereram biomassa seca de *I. galbana*, foram centrifugados 190 mL de cultura a 1100 G durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Cientec, CT6000R). Tal volume de cultura foi diluído à metade da concentração com água deionizada antes da centrifugação. Na segunda etapa, a biomassa congelada foi liofilizada (liofilizador Terroni LT 600, Enterprise) e armazenada até o momento da análise em dissecadores a vácuo.

3.4.2 Crescimento celular

O crescimento das culturas de *I. galbana* foi avaliada por contagem de células fixadas com lugol acético (8 μ L de lugol / mL de cultivo) em hemocitômetro Fuchs-Rosenthal com ajuda de um microscópio ótico (Bioval L1000).

3.4.3 Nitrato residual

Determinou-se a concentração de NO_3^- (proveniente da adição de NaNO₃ à cultura) dissolvido no meio de cultura a partir da leitura espectrofotométrica a 220nm, tal como indica Collos *et al.* (1999) para amostras em água marinha. Como a matéria orgânica também absorve no comprimento de onda de 220nm, utilizou-se um fator de

correção em 275nm, posto que, neste comprimento de onda, o NO_3^- não interfere com a radiação. Além disso, diferentemente de Collos *et al.* (1999), acidificaram-se as amostras para reduzir interferências de outros íons (como hidróxido ou carbonato) (Lourenço, 2006).

Foram utilizadas cubetas de quartzo (1cm de caminho ótico) e 3mL de amostra diluída com água de mar sintética, previamente filtradas em filtros de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μ m de diâmetro (Sartorius). Adicionou-se 1 μ L de HCl 1M à cubeta para medir a densidade ótica (Bioespectro SP-220). A absorbância final foi calculada tal como indica a Equação 3.1. Uma curva padrão foi construída com concentrações de 0 a 0,16 mM de K₂NO₃.

Abs. final = $Abs_{220} - 2 x Abs_{275}$ (3.1)

3.4.4 Pigmentos

Os pigmentos foram extraídos das células através da maceração de amostras de cultivo diluídas 20 vezes e filtradas em filtros de fibra de vidro (Sartourius), com cuidados para evitar incidência de luz branca no macerado. Na primeira etapa, o papel de filtro com as células foi macerado em 5mL de metanol em tubo de ensaio coberto por fita preta, durante 1 minuto e utilizando um bastão de vidro. O líquido resultante da maceração foi imediatamente transferido para tubo de centrífuga igualmente protegido contra incidência de luz branca. A seguir, foram adicionados mais 3mL de metanol ao primeiro tubo de ensaio e macerado por outro minuto. Em segunda etapa, o líquido resultante da maceração foi coletado em tubo de centrífuga o qual foi armazenado por 30 minutos em geladeira, já que se observou que esse tempo foi suficiente para a extração de pigmentos em *I. galbana* (o qual difere com as 24hs reportadas por Lourenço 2006). Após esse período, centrifugou-se a 1100g por 5 minutos (centrífuga Cientec, CT6000R) e se prosseguiu à leitura ótica em cubeta de vidro (Bioespectro SP-220). As amostras foram novamente centrifugadas sempre que a leitura de absorbância a 750 nm superasse o valor de 0,002.

Os teores de clorofilas a e c (chla e chlc) foram estimados pela fórmula de Jeffrey e Haxo (1968) e, o teor de carotenoides (car) (xantofilas e carotenos) pela formula de Wellburn (1994), apresentados nas Equações 3.2, 3.3 e 3.4.

[Chla] $[\mu g_{pig}/mL_{slv}] = 13,8 \text{ x Abs}_{668} - 1,3 \text{ x Abs}_{635}$	(3.2)
[Chlc] $[\mu g_{pig}/mL_{slv}] = 67,3 \text{ x Abs}_{635} - 14,1 \text{ x Abs}_{668}$	(3.3)

 $[Car] [\mu g_{pig}/mL_{slv}] = (1000 \text{ x Abs}_{470} - 2,86 \text{ x [Chla]} - 120,2 \text{ x [Chlb]})/221$ (3.4)

3.4.5 Morfologia celular

Analisou-se a morfologia celular em microscópio ótico (Nikon Elipse E200). Amostras de 3mL de cultivo fresco de *I. galbana* foram empregados. A amostra foi corada com o fluoróforo lipofílico *Nile Red* (0,78M em acetona) 20 minutos antes da análise (Sigma Aldrich) para observação dos grânulos de lipídios com microscopia de fluorescência.

Foi desenvolvida uma rotina computacional em ambiente MATLAB (The Mathworks Inc) para cálculo da relação entre o menor e o maior comprimento ("diâmetros") fornecendo a grandeza "índice de esfericidade" para cada célula fotografada.

3.4.6 Lipídios totais

Os lipídios totais foram extraídos da biomassa de I. galbana com solventes (clorofórmio e metanol) e posteriormente analisados por gravimetría, tal como reportaram Folch et al. (1957). Para tal, pesaram-se entre 80 e 100mg de biomassa seca em um tubo de ensaio, no qual se colocaram 30 pérolas de vidro (0,2cm de diâmetro) e 4mL de água deionizada. Procedeu-se à ruptura das células por agitação com vórtex durante 10 minutos. A seguir, adicionaram-se 5mL de metanol ao tubo, o qual foi agitado por 2 minutos em vórtex. Adicionaram-se 10mL de clorofórmio e utilizou-se vórtex por mais 5 minutos. A mistura já homogeneizada foi filtrada em papel de filtro e o filtrado colocado em proveta com tampa. Foram adicionados 5mL de metanol e 10mL de clorofórmio ao tubo de ensaio e filtrado novamente através do papel de filtro e acrescentados a proveta com tampa, com o fim de lavar o resíduo tanto do tubo como do papel e pérolas de vidro. A seguir, ao volume final da proveta foram adicionados ¹/₄ desse volume de uma solução de KCl 0,88% p/p. Após a separação de fases, descartouse a superior por aspiração. Na sequência, foi adicionado ¹/₄ do volume da fase inferior de uma solução metanol:água (2:1). Novamente, foi descartada a fase superior por aspiração e a fase inferior foi filtrada num papel de filtro enchido (até a metade) com sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em frasco de vidro e colocado em estufa

a 40°C. Após a evaporação do solvente, os lipídios extraídos foram ressuspendidos em 5mL de clorofórmio e rapidamente distribuídos em 5 vidros relógios, previamente pesados (1mL em cada). Deixou-se evaporar o solvente em estufa a 40°C e, a seguir, os vidros foram colocados em dessecadores de vidro para esfriar. Por último, cada vidro relógio foi pesado e a percentagem de lipídios na biomassa liofilizada calculada. O metanol e clorofórmio empregados tinham 2ppm de butil-hidroxi-tolueno (BHT) para evitar a autoxidação de ácidos graxos.

3.4.7 Metil ésteres de ácidos graxos (FAMEs)

O extrato lipídico obtido na determinação dos lipídios totais de *I. galbana* foi transesterificado tal como reportam Jham e Campos (1982). Para isso, o conteúdo de biomassa liofilizada dos 5 vidros relógios foram ressuspendidos com 5mL de clorofórmio:BHT 20ppm, colocados em um frasco de penicilina e armazenados a temperatura negativa. No momento da análise, 200 μ L dessa solução foram transferidos para tubos de vidro de 20 cm de comprimento. Uma vez evaporado o clorofórmio (a temperatura ambiente), foi adicionado 1mL de uma solução de KOH:metanol 0,5M a cada tubo, e colocados em banho a 100 °C por 5 minutos. Após esse tempo, a cada tubo adicionou-se uma mistura de HCl (1M): metanol 4:1 (v/v), que continuaram no banho por mais 15 minutos. Os tubos foram realizadas duas lavagens com éter de petróleo (3mL cada lavagem). O éter provocou a separação de fases. No momento da análise cromatográfica, o éter de petróleo foi evaporado e os FAMEs ressuspendidos em 500 μ L de n-hexano:BHT (2ppm) e guardados em frascos de penicilina.

Os FAMEs assim obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com um cromatógrafo acoplado a um espectrofotômetro de massa (GCMS-QP2010, Shimadzu). A fase estacionária empregada foi a coluna polar C-18 de 30m x 0,25mm (RTX-25, Restek). Para alcançar a separação dos FAMEs na coluna, aplicou-se uma rampa de temperaturas (40 °C, 2 min; 100 °C, 2 min; 220 °C, 20 min). A identificação se realizou por comparação com padrões de Sigma Aldrich (FAME Mix RM-3, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA)

3.4.8 Carboidratos

Avaliaram-se carboidratos solúveis água (açúcares simples, os em oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tal como metil-éteres com grupos redutores ou potencialmente redutores) da biomassa seca de I. galbana pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). Para isso, em frasco tipo vial foram pesados 1mg de biomassa e adicionados 2mL de ácido sulfúrico 1M em banho de gelo. Os frascos em banho foram refrigerados por cerca de 16 a 20hs. Após esta etapa, foram acrescentados 6 mL de água deionizada, e a preparação foi filtrada em filtros de fibra de vidro, previamente tratados em mufla a 400°C por 4h. Recolheram-se 50 µL do filtrado em tubos de ensaio (20 cm de cumprimento), nos quais se adicionaram 950 µL de água deionizada e 500 µL de fenol 3%. Agitou-se manualmente a mistura e adicionaram-se 2,5 µL de H₂SO₄ 1M. Após 30 minutos, foi medida a absorbância a 485 nm. A percentagem de açúcares na biomassa foi deduzida de uma curva de calibração feita com H₂SO₄ e soluções padrão de D-glicose (0 a 50 μ g.mL⁻¹).

3.4.9 Proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas por análise de composição elementar (CHN Perkin-Elmer 2400) com cerca de 5 mg de biomassa liofilizada de *I. galbana*. A análise foi feita por cortesia do Instituto de Química da UFRJ (IQ/UFRJ). O método consiste na carbonização das amostras e quantificação da condutividade térmica dos gases formados (C em CO₂, H₂ em vapor de agua e N₂ em NO₂). A partir da quantidade de N₂ das amostras foi deduzida a quantidade de proteínas totais aplicando a Equação 3.5, de acordo com Lourenço (2006). Para determinar a concentração de N₂ nas amostras, utilizou-se curva padrão de acetanilina do IQ/UFRJ.

Capítulo 4- Resultados e Discussão

A quantificação de crescimento celular e demais análises foram conduzidos em, no mínimo, duplicatas. Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente com o *software* GraphPad Prism (versão 4, Software IncR). Aplicou-se o teste ANOVA (p<0,01) com o método de contrastes de Newman Keuls (Rice 1989) *a posteriori*.

Como etapa preliminar ao início dos experimentos, foi necessário aclimatar as células às condições experimentais definidas, com o fim de maximizar a quantidade de células em um mesmo estado metabólico. Além disso, foi necessário definir um protocolo de produção de inóculos iniciais para garantir que todos os crescimentos fossem iniciados com células no mesmo estado metabólico. Durante a aclimatação celular (dados não apresentados no presente trabalho), observou-se que a elevada concentração de nutrientes não afetou o desenvolvimento das culturas. No entanto, houve dificuldades com a aclimatação à concentração elevada de CO₂ já que se observou que mudanças drásticas na concentração de CO2 no fluxo de aeração (desde a concentração atmosférica de 0,034% até 5%) provocava decréscimo de pH (de 7 a 5 unidades) e consequente morte da cultura. Tal descenso pode levar à morte celular e inativação da anidrase carbônica, como observaram Tang et al. (2011) para outra espécie de microalga e, Kaplan et al. (1986), que reportaram que I. galbana tolera pH entre 5 e 9. Portanto, a adaptação realizou-se por pequenos incrementos diários na concentração de CO₂ no ar alimentado à cultura, controlando-se o pH em valores superiores a 5,5 unidades. A aplicação dos incrementos foi realizada no meio do período de iluminação, onde as células se encontram fotossinteticamente ativas, e, portanto, a concentração de CO₂ atinge valores inferiores aos do período escuro, onde cessa a fotossíntese, ocorrendo a respiração celular (com produção de CO₂), e além disso, ocorre a liberação ao meio do CO₂ que não foi reduzido pela fotossíntese (Bhatti et al., 2002).

4.1 Cinética de crescimento e consumo de NO₃-

Na Figura 4.1, apresenta-se a curva de crescimento e o consumo de nitrato residual do meio de cultivo de *I. galbana* nos três grupos experimentais analisados: controle (0,00V); 0,65V a partir do dia 0 (0,65V D0); e 0,65V a partir o dia 3 (0,65V



D3), mantendo os 0,65V constantes até o final do crescimento em ambos grupos eletroestimulados.

Figura 4.1 Curva de crescimento de *I. galbana* (acima) e concentração de NO₃⁻ no meio de cultivo (abaixo).

Observa-se que o potencial elétrico não provocou diferenças significativas na taxa de crescimento nem no consumo de nitrato, a diferença do reportado para leveduras estressadas com campo elétrico o qual impactou tanto na taxa de crescimento como no

consumo de açúcar (Araujo *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2010) e para microalgas estressadas com campos eletromagnéticos (Small *et al.*, 2011; Hirano *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006). A configuração de campo elétrico escolhida não teria interferido com os processos ou moléculas específicas que levam ao aumento da taxa de crescimento, como aumento na taxa de consumo de oxigênio e ativação da fotossíntese em microalgas (Small *et al.*, 2011; Hirano *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006), e aumento na consumo de açúcar nas leveduras (Small *et al.*, 2011; Hirano *et al.*, 2006), e aumento no consumo de açúcar nas leveduras (Small *et al.*, 2011; Hirano *et al.*, 2006). Alem disso, Araujo *et al.* (2004) reportaram maior consumo de açúcar presumivelmente devido a uma maior permeação da membrana plasmática. Como o campo elétrico de baixa intensidade atua a nível de transportadores protéicos de membrana (e não por poros formados na bicamada lipídica como ocorre sob alta intesidade) (Berg *et al.*, 1991), o campo elétrico teria interferido com a nível de transportadores de açúcar da levedura ou com a parede celular (estrutura inexistente em *I. galbana*) no trabalho citado anteriormente. No entanto, o campo elétrico escolhido neste trabalho não teria interferido com transportadores de nitrato.

Os três grupos experimentais apresentaram uma curva de crescimento característica dos cultivos em batelada. Na curva de crescimento, pode- se diferenciar: a fase exponencial entre os dias 1 e 3, a fase de desaceleração do crescimento, entre os dias 3 e 5; e a fase estacionária, a partir do dia 6. Os cultivos não apresentaram fase *lag* devido a que as células inoculadas se encontravam em fase exponencial e sob os mesmos parâmetros de crescimento. Segundo o reportado em bactérias (Costello, 2012; Loghavy *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 1995) e leveduras (Castro *et al.*, 2001), o potencial elétrico poderia impactar na fase *lag* -no caso ser induzida-, o qual poderia ser corroborado em experimentos futuros em microalgas com a intensidade aplicada.

Observa-se na Figura 4.1 que a concentração de NO_3^- no meio sofreu redução nos primeiros três dias de cultivo, alcançando valores próximos a 0 ppm, e apresentou um leve aumento a partir do dia 4 (menos de 10 ppm) em todos os grupos experimentais, resultado também observado em culturas de *I. galbana* por Picardo *et al.* (2013)a. Collos *et al.* (2005) reportaram que o rápido consumo de nitrato observado nestes experimentos é um mecanismo de sobrevivência de várias espécies de microalgas, as quais capturam o nitrogênio e o armazena na forma de proteínas (por exemplo, Rubisco, a proteína mais abundante das células vegetais). Tal mecanismo lhes confere vantagens na competição por nutrientes com outras espécies.

A depleção de nitrato se correlacionou com o final da fase exponencial das culturas, devendo ter atuado como fator limitante do crescimento. Outro fator limitante observado foi a falta de luz nas culturas, já que no dia 3, com mais de 30.10^6 cel/mL, a penetração de radiação luminosa no interior do reator foi afetada por autossombreamento celular (Park e Lee, 2001). Neste sentido, segundo o descrito por Xue *et al.*, (2011) as microalgas se encontravam sob diferentes graus de intensidade luminosa, indo desde a escuridão (centro do reator) até a intensidade máxima com uma frequência dependente da agitação do meio.

4.2 Análise de biomassa seca: proteínas, carboidratos e lipídios

A percentagem de proteínas, lipídios e carboidratos totais na biomassa liofilizada de *I. galbana* nos cultivos eletroestimulados e sem estimulação elétrica, nos três dias de amostragem é apresentado na Figura 4.2.

As culturas sem eletroestimulação (0,00V) atingiram níveis de proteínas, carboidratos e lipídios que se correlacionaram com os reportados anteriormente para a microalga avaliada (Davinson *et al.*, 1992; Chagas, 2010; Zhu *et al.*, 1997; Mendieta, 2012; Picardo *et al.*, 2013*a*). As pequenas variações obtidas em tais percentagens foram produto da cepa e das condições e estratégia de cultivo, do dia de amostragem e da técnica de análise empregada (Greenwell *et al.*, 2010). Existe a probabilidade de que a biomassa seca analizada tenha uma percentagem de sal marina devido a que a somatória das percentagens de lipidios proteínas e carboidratos são menores ao 70% do total da biomassa, por tanto outras técnicas de lavagem de sal devem ser avaliadas, cuidando de que a osmolaridade do meio não afete a integridade celular. No dia 10 tal percentagem é menor, provávelmente devido à acumulação de outras moléculas orgânicas como osmolitos (Pancha et al., 2014) ou de material inorgânico (Chagas 2010).



Figura 4.2. Lipídios totais(a); carboidratos (b); e proteínas (c) na biomassa seca de *I. galbana* dos grupos controle (0,00V) e eletroestimulados desde os dias 0 (0,65V D0), e 3 (0,65V D3). As diferenças significativas ANOVA (p<0,01) são sinaladas com (*).

Nas culturas sem eletroestimulação, (0,00V) foram obtidos: 21% de proteínas e de carboidrato no final da fase exponencial (dia 3) e 18% de lipídios. Já na fase estacionária (dia 6), observou-se aumento nas percentagens das moléculas de reserva (carboidratos 27% e lipídios 23%) e redução no nível de proteínas em 5% m/m. A menor disponibilidade de nitrogênio intracelular promove a degradação de moléculas aminadas para uso em outras moléculas vitais. O fluxo de carbono e energia em *I. galbana* é direcionado a formar principalmente moléculas de reserva energética como lipídios (TAG) e carboidratos (Sukenik e Wahnon, 1990).

O potencial elétrico não induziu variações significativas no acúmulo de carboidratos ou de proteínas; ao contrário do observado para lipídios, quando constatouse que a eletroestimulação alterou o acumulo de lipídios nas células. Enquanto nas culturas sem eletroestimulação (0,00V), a percentagem de lipídios aumentaria entre os dias 3 e 6, a aplicação de potencial manteria tal percentagem constante nesses dias. No dia 10 fatores de estresse do cultivo estariam mascarando a ação do campo elétrico.

Além disso, observa-se uma redução significativa da percentagem de lipídios no dia 6 do grupo experimental estimulado desde o dia 0 (0,65V D0) com respeito ao grupo controle (0,00V). Tal resultado poderia ser correlacionado ao observado por Hirano *et al.* (2008), já que eles reportaram uma redução de galactolipídios -lipídios majoritários das membranas tilacoides- em culturas estimuladas com campo magnético; e por Sukenik e Wagnhon (1990) os quais encontraram redução de lipídios em *I.galbana* estressada com alta luminosidade. Por tanto, presumivelmente a redução de lipídios totais na biomassa seca de *I. galbana* por ação do campo elétrico seja a nível de membranas. Tal afirmação se correlaciona com o fato de não ter observado câmbios nos grânulos de lipídios por simples visualização ao microscópio ótico e por redução de pigmentos (apresentada na seção seguinte).

Por outro lado, existe a possibilidade de o campo estar induzindo a excreção de lipídios ao meio de cultivo para tal deveria ser constatada a concentração de lipídios no meio de cultura. No entanto reporta-se a quebra das membranas (e do dielétrico da solução) após de valores críticos de potencial elétrico, na ordem dos 100V/m, valores muito superiores ao empregado neste trabalho (0,0014V/m) pelo qual se deduze que a membrana não estaria sendo quebrada.
No dia 10 de cultivo, provavelmente, a ação do campo elétrico foi mascarada pelas condições estressantes do cultivo tal como observaram Liang *et al.* (2006) e Loghavy *et al.* (2007) já que não se observaram interferências nem na percentagem de lipdios totais, nem dos carboidratos e proteínas na biomassa seca.

4.3 Pigmentos: clorofila a, c e carotenóides

A quantidade de pigmentos por célula em *I. galbana* nos cultivos estimulados com potencial elétrico desde os dias 0 (0,65V D0) e 3 (0,65V D3), e sem estimulação (0,00V) é exibida na Figura 4.3. No grupo controle (0,00V) observa-se que as clorofilas diminuiriam entre os dias 3 e 6 e, pelo contrario os carotenóides aumentariam. Jalal *et al.* (2013) e Mendieta (2013) observaram em *I. galbana* um aumento de carotenóides em cultivos estressados com deficiência de nitrato no meio, tal como foi observado neste trabalho. As culturas estressadas por falta de nitrogênio degradam as clorofilas (as quais contem nitrogênio na estrutura) e os complexos protéicos acoplados com tais moléculas. Por outro lado, os carotenóides são solúveis nas membranas atuando como captadores de luz e também como antioxidantes. Tais moléculas são cadeias carbonadas que podem ou não conter oxigênio na sua estrutura, por tanto vias de síntesse poderiam ser ativadas durante estresse por nitrogênio para desviar o fluxo de carbono e energia ou como mecanismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio.

A quantidade de clorofila a por célula foi reduzida significativamente com o campo elétrico nos dias 3 e 6 de cultivo. A quantidade de carotenóides foi reduzida significativamente por campo elétrico no dia 6 de cultivo. Observa-se que o potencial aplicado no dia 3 induz uma redução na concentração de pigmentos por célula no dia 6. Tanto a quantidade por célula de clorofila c como de carotenóides no dia 3 de cultivo também teria sido reduzida por ação do campo elétrico, mas os resultados não foram estadisticamente significativos. No dia 10 a ação do campo se encontraria mascarada por fatores de estresse da cultura.



Figura 4.3. Quantidade (μg/ célula) de clorofila a (Chla) (a), clorofila c (Chlc) (b), e carotenoides (c) nos cultivos 0,65V D0 e 0,65V D3, e controle ("0,00). Resultados com diferencia estatística ANOVA (p<0,01) são sinaladas com (*).</p>

Tais resultados têm analogias com aqueles obtidos em microalgas estimuladas submetidas com campo electromagnético, as quais interferiram com o processo de fotossíntese medida pela redução de ficocianinas e galactolipídios (Hirano *et al.*, 1998), aumento de clorofila a e b e variação dos parâmetros fotossintéticos (Small *et al.*, 2012). Também, o estresse de *I. galbana* promovido por altas irradiâncias provocou degradação de clorofilas e carotenoides e aumento na relação cartenoides/ clorofila a (Sukenik e Wahnon, 1990). Alem disso, na literatura reportaram-se vários estímulos como salino, por temperatura, e osmótico alteram a relação de PSI/PSII e a cadeia transportadora de elétrons (Los e Murata, 2002; Satoh *et al.*, 2014). Por tanto, neste trabalho o campo elétrico estaria interferindo com a fotossíntese, por exemplo, por interferência direta com os cromômeros dos pigmentos, com a cadeia de transporte de elétrons, com o ensamblado dos fotossistemas, etc; ou indiretamente através de espécies reativas de oxigênio, alterações na membrana fotossintética, etc. Ao induzir a polarização de membranas, o campo elétrico também poderia estar interferindo com o gradiente de prótons e passagem através da ATPsintase através da membrana tilacoide.

4.4 Metil ésteres de ácidos graxos (FAMEs)

A composição de FAMEs no extrato lipídico de *I. galbana* dos três grupos experimentais encontram-se na Figura 4.4. Pode se observar que os FAMEs majoritários da microalga foram os derivados do ácido oléico (18:1n-9) e do ácido palmítico (16:0). O saturados 18:0 e 16:0 decresceram no dia 10, e os FAMEs saturados restantes (14:0, 20:0, 22:0, 24:0) permaneceram constantes no decorrer do crescimento. O monoinsaturado 18:1n-9 diminuiu no dia 10 em relação ao dia 3 e percentagem do monoinsaturado 24:1n-9 permaneceu constante no decorrer dos dias de cultivo. Os PUFAs ômega 3 e 6 -linoleico (18:2n-6) e α -linolênico (18:3n-3)- não apresentaram variações. Tais percentagens de FAMEs no extrato lipídico concordam com os reportados na literatura (Fidalgo *et al.*, 1998; Renaud *et al.*, 1990 e Zhu *et al.*, 1997). Esses ácidos graxos se encontram distribuídos entre TAG e membranas (Tzovenis *et al.*, 2013), o que impede inferir na degradação de membranas ou aumento de TAG no dia 10 em relação ao dia 3 a partir da análise dos ácidos graxos avaliados.

Sukenik e Wahnon (1990) reportaram redução de ácidos graxos poliinsaturados -DHA e 18:4n-3- sob estresse de nitrogênio, o que coincide com a tendência observada no caso do DHA no grupo controle (0,00V) e no grupo estimulado desde o dia 3 (0,65V D3), os quais foram reduzidos no dia 6 em relação ao dia 3. Como ambos ácidos graxos se encontram nas membranas de *I. galbana* (sendo distribuído o DHA: 50% em TAG, 15% em glicolipídios e 25% em fosfolipídios) (Devos *et al.*, 2006), a tendência na percentagem desse acido graxo observada neste trabalho indicaria uma maior proporção de TAG do que lipídios de membranas na fase estacionária das culturas de *I. galbana*. Tal afirmação é baseada em que sob deficiência de nitrogênio *I. galbana* induze a acumulação de carbono e energia na forma de TAG e de carboidratos (Figura 4.2). A síntese de TAG se produz por síntese *de novo* e por reciclagem de membranas (Hu *et al.*, 2008) as quais seriam degradadas na fase estacionaria do presente trabalho.

I. galbana pode acumular DHA ou EPA (Devos et al., 2006; Molina Grima *et al.*, 1994). Neste trabalho, a percentagem do derivado do EPA (20:5n-3) foi menor com 0,5% no extrato lipídico, pelo qual se induze que a cepa avaliada é acumuladora de DHA.

A eletroestimulação aumentou significativamente os níveis dos derivados do ácido oléico (18:1n-9) e de DHA (22:6n-3) no dia 6 de cultivo ("0,65V D0" vs "0,00V"). Sukenik e Wahnon (1990) reportaram aumento dos níveis de DHA e de ácido oléico em culturas de *I. galbana* estressadas com alta intensidade luminosa, e aumento de DHA por estresse de baixas temperaturas (Zhu *et al.*, 1997) Small *et al.* (2012) relatam aumento da concentração de ácido oléico em microalga verde estimulada com campo magnético.

Tsovenis *et al.* (2003) afirmam que tanto o DHA como o ácido oléico se encontram distribuídos entre os TAG, fosfolipídios e galactolipidios, podendo ser intercambiados, e que o DHA tem um papel central nas membranas tilacóides de *I. galbana* T-Isso. Outros tipos de estresse celular como térmico (redução de temperatura), salino e osmótico em cianobactérias também induziram o aumento de DHA nas células (Los e Murata, 2004). O aumento de ácidos graxos poliinsaturados frente a estresse térmico, osmótico e salino em cianobactérias ocorreu para evitar danos ao complexo LHCII e degradação de clorofilas frente ao descrêscimo de fluides de membrana induzida (Los e Murata, 1998; Sacamoto e Murata, 2002; Los e Murata, 2004). Também, observou-se pequeno incremento em PUFAs em microalgas irradiadas com luz UV (Liang *et al.*, 2006) presumivelmente como mecanismo de defesa de espécies reativas de oxigênio (Adarme-Vega *et al.*, 2012).

Os estudos citados anteriormente tem demonstrado que a qualidade e intensidade de luz, temperatura, estresse salino e osmótico afetaram as estruturas fotossintéticas, entre eles, cadeia transportadora de elétrons, e a relação entre os complexos PSI e PSII (Satoh et al., 2014). Além disso, as membranas tilacoides respondem a tais estímulos através da variação dos ácidos graxos (Tsovenis *et al.*, 2013). Tais observações podem ser comparadas aos resultados encontrados neste trabalho por aplicação de campo elétrico. Tal campo induziria o aumento de DHA para evitar dano às estruturas fotossintéticas, diretamente por ativação de desaturases, por alteração conformacional ou de grupos eletroestáticos. O campo poderia estar atuando indiretamente através do descenso de fluidez de membrana já que, ao polarizar os lipídios de membrana, poderia induzir a desaturação e elongação de cadeia de ácidos graxos através de sensores protéicos da fluidez de membrana como sugeriram Sacamoto e Murata (2002), ou através de espécies reativas de oxigênio (Adarme- Vega *et al.*, 2012).

O derivado do 18:4n-3 citado em parágrafos anteriores seria bom candidato para acrescentar análises futuras, junto ao 16:1n-7, já que foram encontrados em *I. galbana* (Renaud *et al.*, 1990; Poisson e Ergan, 1990). Adicionalmente reportou-se que o 16:1n-7 é importante na organização das membranas tilacoides e interage com proteínas e pigmentos dos fotossistemas (Sienhelager e Murata, 1998). Então seria um candidato interessante para avaliar em trabalhos de eletroestimulação. Os cromatogramas obtidos no presente trabalho apresentaram três picos de FAMEs adicionais aos picos correspondentes aos padrões empregados. Neles os picos não identificados seriam de 16, 18 e 20 carbonos, deduzido a partir do tempo de eluição (Visentainer e Franco, 2006). Além disso, o FAME de 16 carbonos foi identificado por comparação com a biblioteca do cromatógrafo como o 16:1n-7. O tempo de diluição dos ácidos graxos de 18 e 20 carbonos indica que esses seriam poliinsaturados (Visentainer e Franco, 2006).





4.5 Integridade e morfologia celular

Neste estudo, não se observaram alterações de integridade celular visíveis ao microscópio ótico nem através da coloração lipofílica dos grânulos de TAG em *I. galbana* por ação do campo elétrico. As mudanças nos grânulos de lipídios podem ser observados ao microscópio ótico e de fluorescência tal como reportaram Guihéneuf e Stengel, (2013) em culturas de *Pavlova luthieri* estressadas com deficiência de nitrogênios e crescidas em diferentes concentrações de bicarbonato adicionado ao meio. Neste estudo avaliamos os grânulos de lipídios através da observação da fluorescência do corante lipofílico *Nile Red.* Tal molécula da coloração diferenciada aos lipídios neutros e aos lipídios apolares, obervados com filtros específicos (amarelo e vermelho, respectivamente) (Guihéneuf e Stengel, 2013). Neste estudo nas fotografias de fluorescência observam-se grânulos amarelados, cobertos com a membrana plasmática em tons mais vermelhos devido que usou-se um único filtro, os quais coincidem com as inclusões escuras observadas nas fotografias sem fluorescência, tal como descreveram Ishida e Green (2001) (Figura 4.5)

Observamos que as culturas estressadas com campo elétrico estavam conformadas por mais quantidade de células alongadas (em comparação com o controle). Portanto, decidimos analisar a largura individual das microalgas nas fotografias. Na Figura 4.6b, se observa que na fase estacionária (dias 6 e 10), o grupo eletroestimulado desde o dia 0 (0,65V D0) apresentou maior número de células alongadas do que o grupo sem estimulação (0,00V). Da figura, obtém-se que o índice de esfericidade de 50% das células estimuladas (linha vermelha) do grupo 0,00V foi de 0,82, enquanto tal relação nas células estimuladas foi de 0,7.

Por outro lado, na fase exponencial (Figura 4.6a) obteve-se que o 50% das células controle são mais alongadas do que o grupo electroestimulado. Tal discrepância com os resultados observados na fase estacionaria pode ser devida a que não foi fotografado um numero suficiente de células do grupo controle, alem disso a etapa exponencial se caracteriza por ter células mais pequenas de aquelas em etapa estacionária de crescimento (Lourenço, 2006), por tanto, o campo elétrico poderia não interferir na morfologia observável apenas por microscopia ótica na etapa exponencial de crescimento. No entanto poderia ter aumentado o biovolume celular (por simples observação das fotografias), o qual deve ser medido em experimentos futuros



Figura 4.5. Fotografias de *I. galbana* e de fluorescencia (microscópio ótico, 100x filtro vermelho) do grupo sem estimular ("0,00V"), eletroestimulados desde o dia 3 ("0,65V D3"). (a) distribuição no dia 6; (b) distribuição no dia 10

Também, observamos que as células mais envelhecidas adotaram morfologias cada vez mais alongadas, tanto no grupo controle, como nos grupos eletroestimulados (dia 3< dia 6< dia 10). Portanto, o campo elétrico poderia estar atuando como um fator de estresse adicional que leva ao maior alongamento celular. O campo elétrico, por exemplo, poderia estar induzindo a acumulação de moléculas que ajudem na manutenção da osmolaridade celular (Pancha *et al.*, 2014), a qual poderia ser induzida pela alteração da permeabilidade de membrana, por indução de espécies reativas de oxigênio, etc.

Tal observação pode ser respaldada pelo reportado por Chagas, (2010) que observou aumento no biovolume de *I. galbana* em fase estacionária, assim como por Tzovenis *et al.*, (2003), que reportaram aumento do biovolume dessa microalga como resposta ao aumento da intensidade lumínica. Em concordância com tais resultados, foram reportadas alterações morfológicas na microalga pleomórfica *S. oblíquos* submetida a estresse por nitrogênio, a qual agrupou-se em colônias, sintetizou espigas celulares, aumentou o biovolume e diminuiu a largura, quando foi submetida à deficiência de nitrogênio (Pancha *et al.*, 2014). Também o estresse induzido por campo electromagnético alterou a estrutura celular detectada através de microscopia eletrônica, uma técnica mais sensível do que a microscopia ótica (Small *et al.*, 2012). Chen *et al.* (2009) observaram alterações morfológicas em bactéria (*Vibrio parahaemolyticus*) quando a submeteram a estresse por frio e deficiência de nutrientes, e comprovaram a indução da expressão de genes associados ao citoesqueleto bacteriano.

As fotografias (100X) da Figura 4.7 mostram células de *Isochrysis galbana* obtidas nos experimentos correspondentes à Figura 4.6. Notam-se células com baixa esfericidade (alongadas e com maior número de grânulos no grupo controle) e com alta esfericidade (circulares e com menor número de grânulos). Também se observa que as células eletroestimuladas apresentaram morfologias diversas e não apenas mais alongadas.



Figura 4.6. Fração cumulativa x Índice de esfericidade de *I. galbana* (diâmetro menor/diâmetro maior) dos grupos controle ("0,00V"), e eletroestimulados desde os dias 0 ("0,65V D0") 3 ("0,65V D3"). (a) Dia 3; (b) dia 6, (c) dia 10.



Figura 4.7. Fotografias típicas de *I. galbana* (microscópio ótico, 100x) do grupo sem estimular (0,00V), eletroestimulados desde o dia 0 (0,65V D0) e eletroestimulados desde o dia 3 (0,65V D3). (a) distribuição no dia 3; (b) distribuição no dia 6, (c) distribuição no dia 10

Capítulo 5- Conclusões e Considerações finais

Este trabalho apresentou respostas celulares de cultivos de microalga *Isochrysis* galbana quando eletroestimuladas, avaliando-se as respostas celulares composição bioquímica, crescimento e morfologia celular, em batelada aerada com alta concentração de CO₂ (5% de CO₂ adicionado ao fluxo de aeração). O campo elétrico aplicado foi de baixa intensidade visando preservar viabilidade celular, taxa de crescimento e estimular a produção de metabólitos de alto valor agregado – PUFA ω 3-associados à captura de CO₂. *I. galbana* é produtora primaria de EPA e DHA, ácidos graxos com comprovados efeitos benéficos à saúde. Esses podem ser extraídos em etapa anterior à produção de biocombustíveis ou poderiam ser utilizados no enriquecimento de alimentos em pastas da microalga.

Observou-se que a eletroestimulação não alterou o número de células ao final do cultivo, isto é, não afetou o crescimento celular. Com a biomassa liofilizada de *I. galbana*, determinou-se a composição bioquímica celular em termos de percentagem de proteínas totais, carboidratos e lipídios totais. Os resultados experimentais indicaram que a eletroestimulação não interferiu no acúmulo de carboidratos nem na percentagem de proteínas. No entanto, o campo elétrico modulou a resposta em lipídios totais das células: ao contrário do comportamento observado no grupo controle (sem eletroestimulação), no qual a percentagem aumentou na fase estacionária inicial em relação à fase exponencial, no grupo eletroestimulado o teor de lipídio foi mantido constante entre as duas etapas de crescimento. Em consequência, obteve-se menor quantidade de lipídios na biomassa eletroestimuladas (aproximadamente de 5% no grupo estimulado desde o dia 0 do experimento, 0,65VD0 vs. 0,00V).

A concentração de pigmentos por célula foi determinada a partir do cultivo fresco de *I. galbana*. Diferentemente do obtido para acúmulo de lipídios, o campo elétrico provocou redução de clorofilas e carotenoides na fase estacionária em relação à fase exponencial. O estímulo elétrico provocou a redução no conteúdo de pigmentos por célula no início da fase estacionária, e, também, de clorofila *a* durante o final das fase exponencial, quando o potencial é aplicado desde o início do cultivo.

O perfil de ácidos graxos foi avaliado – e termos de percentagem de FAMEs presente no estrato lipídico após transesterificação – de todos os grupos experimentais. O campo elétrico aplicado desde o início do experimento aumentou a percentagem dos derivados metílicos do ácido oleico (18:100-9) e do DHA (22:600-3) na fase estacionária inicial.

O campo elétrico não afetou a integridade celular visível ao microscópio ótico. O campo elétrico alterou a morfologia celular analisada por microscopia ótica: as culturas eletroestimuladas apresentaram maior percentagem de células alongadas. As células mais alongadas seriam produto de cultivos estressados por ação do campo elétrico, conclusão deduzida da observação de que células envelhecidas e culturas de microalgas estressadas por deficiência de nitrogênio (Pancha *et al.*, 2014) também apresentaram tal morfologia.

Neste trabalho concluímos que o campo elétrico modulou não apenas o perfil bioquímico de *I. galbana*, se não também a morfologia celular. O campo elétrico poderia ser utilizado para direcionar o metabolismo de *I. galbana* para o aumento de DHA no extrato lipídico com o fim de aumentar o valor nutricional dos alimentos. Tal representa um desafio de importância global já que o DHA é um ácido graxo considerado essencial para o ser humano mas insuficiente nas dietas ocidentais, de custo alto para a população. No contexto de biorefinaria, tal ácido graxo poderia ser extraído prévio á produção de combustíveis a partir da biomassa de microalga.

Como sugestões do presente trabalho, experimentos futuros poderiam também avaliar o peso celular, peso orgânico, conteúdo de prolina (osmoregulador celular avaliado por Pancha *et al.* (2014) em cultura de microalga) e em cinzas nas células eletroestimuladas e sem estímulo elétrico, assim como o volume celular e a ultraestrutura celular para verificar se células mais alongadas seriam resultado de células mais pesadas ou vacúolos maiores, entre outros. Adicionalmente, a floculação de células eletroestimuladas frente a célula não estimuladas por potencial elétrico deve ser avaliada.

Além disso resulta necessário estudar outras formas de aplicação para aumentar a produtividade na biomassa e minimizar a perda de lipídios, *i.e.*, na forma de pulsos, menor tempo de duração, em cultivos contínuos, em sinergia com estímulos que aumentem a produtividade de lipídios na biomassa, etc. Assim como também o impacto em outras microalgas autotróficas produtoras de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

Capítulo 6- Referências Bibliográficas

ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. Microb Cell Fact, v. 11, p. 96, 2012.

ADEY, W.R. Biological Effects of Electromagnetic Fields. Journal of Cellular Biochemistry v. 51, p.410-416, 1993.

ALONSO, L.; GRIMA, E. M.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; SÁNCHEZ, J. L.; GARCÍA CAMACHO, F. F. Fatty acid variation among different isolates of a single strain of *Isochrysis galbana*. The International Journal of Plant Biochemistry, v.31, n. 11, p.3901-3904, 1992.

ALONSO, D. L.; GRIMA, E. M.; PEREZ, J. A.; SÁNCHEZ, J. L.; CAMACHO, F. G. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. Aquaculture v.102, n.4, p. 363-371, 1992.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gas e Biocombustíveis, Disponível em <u>http://www.anp.gov.br/</u>, último acesso: Setembro 2013.

AOCS (Editado por CHRISTIE, W). The Lipid Library. Lipid Chemistry, Biology, Technology & Analysis. Board. Disponible en http://lipidlibrary.aocs.org/, último aceso: Julio, 2013.

ARAÚJO, O. Q.; COELHO, M. A. Z.; MARGARIT, I. C.; VAZ-JUNIOR, C. A.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Electrical stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, n. 1-2, p. 97-103, 2004.

ARAÚJO, O. Q. F.; OLIVEIRA, A. A. C.; TORRES, C. C. O.; ROCHA-LEÃO, M. H., MARGARIT, I. C. P.; COELHO, M. A. Z. Glucose Uptake in Electrically Stimulated Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6) Copenhagen, 16-20 September 2007.

ATTA, M; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Bioresource technology, v. 148, p. 373-378, 2013.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae- anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Press. 2006.

BERG J,M, TYMOCZKO, J.C, STRYER, L. Biochemistry 5^{ta} ed. W. H. Freeman, 2002

BERG, H. Basic applications of electric fields on biological cells. Bioelectrochemistry and Bioenergelics, v.27, n.2, p.89-97, 1992.

BERG, H. Possibilities and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology. Bioelectrochemistry and Bioenergetics v.38, n. 1, p.153-159, 1995

BHATTI, S.; HUERTAS, I. E.; COLMAN, B. Acquisition of inorganic carbon by the marine haptophyte *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). Journal of phycology, v.38, n.5, p. 914-921, 2002.

BNDES 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar : energia para o desenvolvimentosustentável / organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro: BNDES,2008. Disponível em <u>http://www.iea.sp.gov.br/out/bioenergia/textos/bio 06 2008.pdf</u>

BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R.. Sustainable biofuels from algae. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, v. 18, n. 1, p. 13-25, 2013.

CAMPENNI, L.; NOBRE, B. P.; SANTOS, C. A.; OLIVEIRA, A. C.; AIRES-BARROS, M. R.; PALAVRA, A. M. F.; GOUVEIA, L. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. Applied microbiology and biotechnology, v. 97, n. 3, p. 1383-1393, 2013.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal Reactors. A Review of Enclosed System Designs and Performances. Biotechnology Programme v. 22, n.6, p. 1490-1506, 2006.

CARVALHO, A. P.; MONTEIRO, C. M.; MALCATA, F. X.. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova* lutheri. Journal of Applied Phycology, v. 21, n. 5, p. 543-552, 2009.

CASTRO, I.; OLIVEIRA, C.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A.. The Effect of the Electric Field on Lag Phase, β-Galactosidase Production and Plasmid Stability of a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain Growing on Lactose. Food Bioprocess Technology v.5, n. 8, p. 3014–3020, 2012.

CGEE.Química Verde no Brasil: 2010-2030. 2010

CHAGAS, E, B. Influência do Estresse Nutricional Programado na Composição da Microalga Marinha *Isochrysis galbana*. Tese apresentada ao corpo docente de Engenharia Química, Universidade Federal de Natal, para receber o grau de mestre em ciências, 2010.

CHAUTON, M. S.; OLSEN, Y.; VADSTEIN, O. Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. Biomass and Bioenergy, v. 58, p. 87-94, 2013.

CHEN, W., HAN, Y., CHEN, Y., & XIE, J. T. Field-induced electroconformational damages in cell membrane proteins: a new mechanism involved in electrical injury. Bioelectrochemistry and Bioenergetics v.47. p. 237–245, 1998.

CHEN, S. Y.; JANE, W. N.; CHEN, Y. S.; WONG, H. C. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. International Journal of Food Microbiology v.129, n.2, p.157–165, 2009.

CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; WANG, L.; LI, Y.; CHEN, Q.;... e RUAN, R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuel approach. Interface Journal of Agriculturue & Biotechnology, v. 2, n. 4, p.1-30, 2009.

CHI, X.; ZHANG, X.; GUAN, X.; DING, L.; LI, Y.; WANG, M.; ... e QIN, S. Fatty acid biosynthesis in eukaryotic photosynthetic microalgae: identification of a microsomal delta 12 desaturase in *Chlamydomonas reinhardtii*. The Journal of Microbiology, v. 46, n. 2, p. 189-201, 2008.

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

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. Journal of Biotechnology, v. 167, n.3, p.201–214, 2013.

CHISTI. Y (editor: Posten e Walter). Microalgal Biotechnology: Potential and Production. Walter de Gruyter, 2012. p. 191, 2012.

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, C. H.; KUAN, T. C.; ONG, S. C.; LIN, C. S. Reduction of CO2 by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor.Bioresource technology, v. 99, n. 9, p. 3389-3396, 2008.

CHO, H. Y.; YOUSEF, A. E.; SASTRY, S. K. Growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus* under ohmic heating. Biotechnology and bioengineering, v. 49, n. 3, p. 334-340, 1996. CHRISTIE, W,W. Gas chromatography and lipids, a practical guide. Oily Press, 1990.

CHU, F. F.; CHU, P. N.; SHEN, X. F.; LAM, P. K.; ZENG, R. J. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. Bioresource technology, v. 152, p. 241-246, 2014.

CI, Y. X.; FENG, J.; JIANG, Z. W.; LUO, D. Z. The voltammetric behavior of *Saccharomyces cerevisiae* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 43, n.2, p. 293-296, 1997.

COLLOS, Y.; MORNET, F.; SCIANDRA, A.; WASER, N.; LARSON, A.; HARRISON, P. J. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. Journal of Applied Phycology, v. 11, n. 2, p. 179-184, 1999.

COLLOS, Y.; VAQUER, A.; SOUCHU, P. Acclimation Of Nitrate Uptake By Phytoplankton To High Substrate Levels. Journal of phycology, v. 41, n. 3, p. 466-478, 2005.

COSTELLO, S.R. Effect of Electric Field on Growth Kinetics of Yogurt Starter Cultures, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Apresentado em cumprimento parcial dos requisitos para o grau de Mestre em Ciências na Escola de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Ohio, 2012.

COURCHESNE, N.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN, C. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. Journal of Biotechnology, v.141, n.1, p. 31-41, 2009.

CÚPULA DOS POVOS. Declaração Final Cúpula dos Povos na Rio+20 por Justiça Social e Ambiental em defesa dos bens comuns, contra a mercantilização da vida, 2012. Disponível em: <u>http://cupuladospovos.org.br/2012/06/declaracao-final-da-cupula-dos-povos-na-rio20-2/</u>

DAVINSON K; FLYNN K.; CUNNINGHAM A. Non-Steady state ammonium-limited growth of the marine phytoflagellate *Isochrysis galbana* Parke. New Phytologyst. v. 122, n.3, p. 433-438, 1992.

DIMOVA, R.; RISKE, K.; ARANDA, S.; BEZLYEPKINA, N.; KNORR, R. Giant vesicles in electric fields. Soft Matter, v.3, n.7, p. 817-827, 2007.

DO AMARAL MENDES, A. P.; DA COSTA, R. C. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. BNDES Setorial 31, p. 253-280, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P..; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analitical Chemistry, v.29, n.3, p.350–356, 1956.

FENG, J.; CI, Y. X.; GAO, C. M.; LI, Y. Z. Voltammetric behavior of living cells T. shanghaiensis and its bioanalytical application; Bioelectrochemistry and Bioenergetics v. 44, n.1, p. 89-93, 1997.

FIDALGO, J.P.; TORRES, E.; SUKENIKM, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture, v. 166,, n. 1, p.105-116, 1998.

FOCKE, W.; WESTHUIZEN I.; GROBLER A.; NSHOANE K.; REDDY J.; LUYT A.The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. Fuel v. 94, n. 5, p. 227–233, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, v. 226, n. 1, p. 497, 1957.

FREIRE, L.; MOURA, C. V.; SOLEDADE, L. E.; STRAGEVITCH, L.; CORDEIRO, Â. M.; SANTOS, I. M.; SOUZA, A. G. Evaluation of the oxidative stability and flow properties of quaternary mixtures of vegetable oils for biodiesel production. Fuel v. 95, p. 126–130, 2012.

GAZZONI, D. L. Balanço de emissões de CO₂ por biocombustíveis no Brasil: histórico e perspectivas. Embrapa Soja, 2012. Disponível em http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc_334_OL.pdf

GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. CO₂ Concentrating Mechanism in Microalgae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. Annual Review of Plant Biology, v. 56, p. 99-131, 2005.

GUIHÉNEUF, F.; STENGEL, D. B. LC-PUFA-Enriched oil production by microalgae: Accumulation of lipid and triacylglycerols containing n-3 LC-PUFA is triggered by nitrogen limitation and inorganic carbon availability in the marine haptophyte *Pavlova lutheri*. Marine drugs, v. 11, n. 11, p. 4246-4266, 2013.

GOLBERG, I.; COHEN, Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. Biochimie v. 93, n.1, p. 91-100, 2011.

GUILLARD, R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of Marine Invertebrate Animals. Springer US, p. 29-60, 1975.

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

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. Journal of the Royal Society Interface v. 7, n. 46, p. 703-726.

HÄDER, D. P. Influence of electric fields on photophobic reactions in blue-green algae. Archives of Microbiology, v. 114, n. 1, p. 83-86, 1977.

HAIMOVICH-DAYAN, M.; GARFINKEL, N.; EWE, D.; MARCUS, Y.; GRUBER, A.; WAGNER; H., ... E KAPLAN, A.. The role of C4 metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. New Phytologist, v. 197, n. 1, p. 177-185, 2013.

HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium Spirulina platensis. Journal of fermentation and bioengineering, v. 86, n. 3, p. 313-316, 1998.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J; S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga< i> *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresource technology, v. 113, p. 244-252, 2012.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The Plant Journal. v, 54, n.4, p. 621–639. 2008.

HUNT, R. W.; ZAVALIN, A.; BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioennergy application. International Journal of Molecular Sciences. v. 10, n.10, p. 4515-4558, 2009.

ISHIDA, K.; GREEN B.R. Second- and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: Phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. v. 99, n 14, p. 9294- 9299, 2002.

IPPC. The IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation Intergovernamental Panel of Climate Change, Cambridge University Press, 2011.

JACOB, D. Introduction to Atmospheric Chemistry. Princeton University Press, 1999.

FERNANDEZ, F. G. et al. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. Biotechnology and bioengineering, v. 58, n. 6, p. 605-616, 1998.

JALAL, K. C. A.; SHAMSUDDIN, A. A.; RAHMAN, M. F.; NURZATUL, N. Z.; ROZIHAN, M. Growth and Total Carotenoid, Chlorophyll a and Chlorophyll b of Tropical Microalgae (*Isochrysis sp.*) in Laboratory Cultured Conditions. Journal of Biological Sciences, v. 13, p. 10-17, 2013.

JHAM G.N.; TELES F.F.F.; CAMPOS L.G. Use of aqueous HCI/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. Journal of the American Oil Chemists Society. v.59, n 10, p.132-133, 1982.

KAPLAN, D.; COHEN, Z.; ABELIOVICH, A. Optimal growth conditions for Isochrysis galbana. Biomass, v 9, n.1, p. 37-48, 1986.

KIM, S. M.; KANG, S. W.; KWON, O. N.; CHUNG, D.; PAN, C. H. Fucoxanthin as a Major Carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of Extraction for Commercial Application. Journal of Korean Society Applied Biology and Chemistry v.55, n.4, p. 477–483, 2012.

KIM, K. H.; Choi, I. S.; Kim, H. M.; Wi; S. G.; Bae, H. J. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. Bioresource technology, v. 153, p. 47-54, 2014.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; ISKANDAROV, U.; COHEN, Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. Applied microbiology and biotechnology, v. 91, n. 4, p. 905-915, 2011.

LEONARD, A.; PEREIRA,S.; SPRECHER, H.; HUANG S. Y. Elongation of long chain fatty acids. Progress in lipid research. v. 43, n 1, p. 36- 54. 2004.

LIANG, Y; BEARDALL, J.; HERAUD, P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of< i> *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* Bacillariophyceae). Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 82, n. 3, p. 161-172, 2006.

LIU, C.P.; LING, L. P. Ultrastructural study and lipid formation of Isochrysis sp. Botanical Bulletin of Academia Sinica, v.42, p.207-214, 2001.

LI, Z.Y.; GUO, S.; LI, L.; CAI, M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivaton and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. Bioresourse Technology, v. 98, n 3, p.700-705, 2006.

LIPID MAPS CONSORTIUM. Lipidomic Gateway. Nature Publishing Group (NPG) Dsiponível em http://www.lipidmaps.org/. Último acceso: Julio del 2011.

LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E.. Effect of Moderate Electric Field on the Metabolic Activity and Growth Kinetics of *Lactobacillus acidophilus*. Biotechnology and Bioengineering, v. 98, n.4, p. 872-881, 2007

LOS, D.; MURATA, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1394, n. 1, p. 3-15. 1998.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. Rio de Janeiro: RiMa, 2006.

MACEDO, I. de C. LEAL, M. R. L. V., SILVA, J. E. A. R. Balanço das emissões de gases do efeito estufa na produção e no uso do etanol no Brasil. Secretaria do Meio Ambiente, Governo de São Paulo, v. 19, 2004.. Disponível em <u>http://www.unica.com.br/</u>.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.; BROCK, T. D. Biología de los Microorganismos. Madrid: Pearson Education, .2004.

MARCHETTI, J.; BOUGARAN, G.; LE DEAN, L.; MEGRIER, C.; LUKOMSKA, E.; KAAS, R.; ...e CADORET, J. P. Optimizing conditions for the continuous culture of Isochrysis affinis galbana relevant to commercial hatcheries. Aquaculture v. 115, p. 326-329, 2012.

MARKX G.H. The use of electric fields in tissue engineering. Organogenesis. v. 4, n. 1, p. 11-17, 2008.

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

MCLAUGHLIN S.; POO M. M. The role of electro-osmosis in the electric field induced movement of charged macromolecules on the surfaces of cells. Biophysical Journal, v. 34, n.1, 1981.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy v. 34, n.1, p. 1–5, (2008.

MOLINA GRIMA, E.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; GARCÍA SÁNCHEZ, J. L.; GARCÍA CAMACHO, F.; LÓPEZ ALONSO, D. EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. Procees Biochemistry, v.27, p.299- 305, 1992.

MOLINA GRIMA E.; SANCHEZ PEREZ J.A.; GARCIA CAMACHO, F.; GARCIA SANCHEZ J.L.; FERMINDEZ SEVILLA J. Variation of fatty acid profile with solar cycle in outdoor chemostat culture of *Isochrysis galbana* ALII-4. Journal of Applied Phycology, v. 7, n, 2, p. 129-134, 1995.

MOHSENPOUR, S. F.; RICHARDS, B.; WILLOUGHBY, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. Bioresource Technology, 2012.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; ... e TEIXEIRA, J. A.. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. Biotechnology Advances, v. 28, n.6, p, 817–830, 2010.

NAKANISHI, K.; TOKUDA, H.; SOGA, T.; YOSHINAGA, T.; TAKEDA M. Effect of electric current on growth and alcohol production by yeast cells. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 85, n. 2, p. 250-253, 1998.

NAKANISHI, A.; AIKAWA, S.; HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of lipid productivities under different

CO< sub> 2</sub> conditions of marine microalgae *Chlamydomonas sp.* JSC4. Bioresource technology, v. 152, p. 247-252, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principios de Bioquímica, 2001.

NUÑO, K,; VILLARRUEL-LÓPEZ, A.; PUEBLA-PÉREZ, A. M.; ROMERO-VELARDE, E.; PUEBLA-MORA, A. G.; ASCENCIO, F. Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. Journal of Functional Foods.Effects, 2012.

OBATA, M.; TAGUCHI. S. The xanthophyll-cycling pigment dynamics of Isochrysis galbana (Prymnesiophyceae) during light–dark transition. Plankton Benthos Resource, v. 7, p. 101–110, 2012.

OLIVEIRA, A. A. C.; SOUSA, T. V. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; ARAUJO, O. Q. F. Study of morphological and physiological parameters of cultures of *Yarrowia lipolytica* undergone electrochemical stress. Chemical Engineering Transactions, v.20, p. 133-138, 2010.

PICARDO, M. C.; MEDEIROS, J. L. D.; ARAÚJO, O. D. Q. F.; CHALOUB, R. M. Effects of CO₂ Enrichment and Nutrients Supply Intermittency on Batch Cultures of *Isochrysis galbana*. v. 143, p. 242-250, 2013, (a).

PICARDO, M. C.; DE MEDEIROS, J. L.; MONTEIRO, J. G. M.; CHALOUB, R. M.; GIORDANO, M.; ARAÚJO, O. D. Q. F.. A Methodology for Screening of Microalgae as a Decision Making Tool for Energy and Green Chemical Process Applications. Clean Technologies and Environmental Policy p. 1-17, 2013. (b)

PANCHA, I.; Chokshi, K.; George, B.; Ghosh, T.; Paliwal, C.; Maurya, R.; Mishra, S.Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. Bioresource Technology, 2014.

PAVLIN, M.; SLIVNIK, T.; MIKLAVCIC, D. Effective Conductivity of Cell Suspensions. transactions on biomedical engineering, v. 49, n. 1, v. 77 2002.

POISSON, L.; ERGAN, F. Docohexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. Journal of Biotechnology. v. 91, n. 1 p. 75-81, 2001.

QI, B.; BEAUDOIN, F.; FRASER, T.; STOBART, A. K.; NAPIER, J. A.; LAZARUS, C. M.. Identification of a cDNA encoding a novel C18-v9 polyunsaturated fatty acidspeci¢c elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, Isochrysis galbana. FEBS Letters v.510, n. 3, p.159- 165, 2002.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004.

RENAUD, S. M.; PARRY, D. L.; THINH, L. V.; KUO, C.; PADOVAN, A.; SAMMY, N.. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture . Journal of Applied Phycology v. 3, n. 1, p. 43-53, 1991.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989.

RIEKHOF, R.; BENNING, C. Glycerolipid biosynthesis. The Chlamydomonas sourcebook: Organellar and metabolic processes vol, v. 2, p. 41-68, 2009.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DE DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; CARBALLIDO, J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.

ROSA, S. M.; SORIA, M. A.; VÉLEZ, C. G.; GALVAGNO, M. A. Imporvment of twostages fermentation process for docohexanoic acid by Aurantiochtrium limacum SR21 appling statical experimental designd and data analysis. Bioresource technology v 7. N. 7, p. 2367-2374, 2010.

ROTH, B. J. Electrical conductivity values used with the bidomain model of cardiac tissue. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on, v. 44, n. 4, p. 326-328, 1997.

SÁNCHEZ, Á.; MACEIRAS, R.; CANCELA, Á.; PÉR.EZ, A. Culture aspects of Isochrysis galbana for biodiesel production. Applied Energy, v. 101, p. 192-197, 2013

SAKAMOTO, T.; MURATA, N. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. Current opinion in microbiology, v. 5, n. 2, p. 206-210, 2002.

SATOH, A.; Kurano, N.; Senger, H.; Miyachi, S. Regulation of energy balance in photosystems in response to changes in CO2 concentrations and light intensities during growth in extremely-high-CO2-tolerant green microalgae. Plant and cell physiology, v. 43, n. 4, p. 440-451, 2002.

SCOTT, S.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology, v. 21, n. 3, p. 277-286, 2010.

SIEGENTAHALER, P.A; MURATA, N. Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics. Klumer Academic Publishers, 1998.

SMALL, D. P.; HÜNER, N.; WAN, W. Effect of static magnetic fields on the growth, photosynthesis and ultrastructure of *Chlorella kessleri* microalgae. Bioelectromagnetics, v. 33, n. 4, p. 298-308, 2012.

TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. Marine drugs, v. 9, n. 6, p. 1101-1118, 2011.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. Bioresource Technology, v. 102, n. 3, p. 3071-3076, 2011.

TORKAMANI, S.; WANI, S.N.; TANG, Y.J.; SURESHKUMAR, R.; Plasmonenhanced microalgal growth in miniphotobioreactors. Applied Physics Letters, v. 97, n. 043703,2010.

TZOVENIS, I.; DE PAUW, N.; SORGELOOS, P. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. Aquaculture, v. 216, n. 1, p. 203-222, 2003.

POISSON, L.; ERGAN, F. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis* galbana. Journal of biotechnology, v. 91, n. 1, p. 75-81, 2001.

UNEP (United Nations Environment Programme) Views on options and ways for further increasing the level of ambition. Submissions from intergovernmental organizations.

UNFCCC. United Nations Framework of Climate Change. Dísponivel em <u>http://unfccc.int/2860.php</u>, último acesso Outubro de 2013.

U.S. DOE. National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program. 2010. Disponible en: <u>http://biomass.energy.gov</u>

VELIZAROV, S. Electric and magnetic fields in microbial biotechnology: possibilities, limitations, and perspectives. Electro and Magnetobiology, v. 18, n. 2, p. 185-212, 1999.

VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação. São Paulo: Varela, 2006. 120p.

WANG, H.; ZENG, X. B.; GUO, S. Y.; LI, Z. T Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. Bioelectromagnetics, v. 29, n. 1, p. 39-46, 2008.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. Effect of Photoperiod on the Growth of Unicellular Microalgae Nannochloropsis sp.Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v. 6, n. 6, p. 631-633, 2012.

WARD, O P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. Process Biochemistry, v. 40, n. 12, p. 3627-3652, 2005.

XU, J.; FAN, X.; ZHANG, X.; XU, D.; MOU, S.; CAO, S.; ... e YE, N. Evidence of coexistence of C3 and C4 photosynthetic pathways in a green-tide-forming alga, *Ulva prolifera*. PLoS One, v. 7, n. 5, p. e37438, 2012.

XU, J.; ZHANG, X.; YE, N.; ZHENG, Z.; MOU, S.; DONG, M.; ... & MIAO, J. Activities of principal photosynthetic enzymes in green macroalga *Ulva linza*: functional implication of C4 pathway in CO2 assimilation. Science China Life Sciences, v. 56, n. 6, p. 571-580, 2013.

XUE, S.; SU, Z.; CONG, W. Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. Journal of biotechnology, v. 151, n. 3, p. 271-277, 2011.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/ dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal, v. 6, n. 2, p. 87-102, 2000.

YAOITA, M.; IKARIYAMA, Y.; AIZAWA, M. Electrical effects on the proliferation of living HeLa cells cultured on optically transparent electrode surface. Journal of biotechnology, v. 14, n. 3, p. 321-332, 1990.

YU, C. C.; CHEN, H. W.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C.; CHIEN, S. C.; KUO, Y. H.; ... e CHAO, L. K. Chemical composition and bioactivities of the marine alga *Isochrysis galbana* from Taiwan. Natural Product Communications, v5 , p. 1941-1944, 2010.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K.; CHAO, T. M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1.Journal of applied phycology, v. 9, n. 5, p. 451-457, 1997.