UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

RAQUEL JULIANA ROMO BUCHELLY

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE *Isochrysis galbana* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS, VISANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (ÔMEGA 3)

Rio de Janeiro – RJ/Brasil

2015

RAQUEL JULIANA ROMO BUCHELLY

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE *Isochrysis galbana* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS, VISANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (ÔMEGA 3)

Dissertação de mestrado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Dr. Donato A. Gomes Aranda.

Rio de Janeiro – RJ/Brasil

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Buchelly, Raquel Juliana Romo.

Avaliação do perfil de ácidos graxos e respostas bioquímicas de *Isochrysis galbana* sob diferentes condições fotoautotróficas, visando a produção de ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3) / Raquel Juliana Romo Buchelly - Rio de Janeiro, 2015.

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, Rio de Janeiro, 2015.

107 f.

Orientador: Donato A. Gomes Aranda

1. Microalgas. 2. Ácidos graxos. 3. Otimização. 4. Ômega 3. I. Aranda, Donato Alexandre Gomes (Orient.). II Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III Titulo

RAQUEL JULIANA ROMO BUCHELLY

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE *Isochrysis galbana* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS, VISANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (ÔMEGA 3)

Dissertação de mestrado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada por:

Donato Aranda

Prof. Dr. Donato Alexandre Gomes Aranda — Orientador

Prof. Dra. Suely Pereira Freitas

Dr. Nelson Furtado

Leonardo Bacellar

Dr. Leonardo Bacellar

Rio de Janeiro – RJ/ Brasil

2015

DEDICATORIA

Dedico-lhes este trabalho às quatro
pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais, Luis e Esperanza, que com seu amor,
apoio e dedicação incondicional me ensinaram sempre
a lutar e perseguir meus sonhos.

Ao meu irmão, David, por ser minha fonte de
inspiração e um exemplo a seguir.

Ao meu amor, Cesar, por sua compreensão,
carinho e apoio neste processo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ser meu guia e conceder-me a força necessária para persistir até a finalização de meu trabalho.

Ao meu orientador, o Professor Donato Aranda, por ter aberto as portas do seu laboratório e me dar a oportunidade de pertencer a seu grupo de pesquisa. Obrigada pelo apoio e confiança depositada em mim ao longo deste tempo.

À Yordanka Reyes pelo apoio, carinho, confiança e pela ajuda na solução de problemas.

À minha guerreira, Camila Cristane, por estar sempre do meu lado, me apoiando nos momentos bons e nos difíceis, pela companhia na longa jornada de experimentos, amizade e o grande carinho demostrado.

À Carolina Viêgas pelo acolhimento, ajuda e boa disposição para esclarecer minhas duvidas.

À Cristiane Mesquita pelo companheirismo, paciência, colaboração com as análises de cromatografia e solução de problemas.

À professora Suely Freitas por permitir o uso do equipamento para fazer as análises de espectrofotometria.

Aos companheiros e funcionários do grupo GreenTec – Laboratório de Tecnologias verdes, pelo acolhimento, amizade e grande ajuda em meu trabalho, especialmente a Rosa, Mariana B, Mariana F, Carla, Ana Paula, Neumara, Leo, Deusa, Andreina, Alex e Rene.

Aos meus amigos e colegas, Ivan Sandoval e Germildo Juvenal, pela agradável companhia, divertimento, conselhos nos momentos difíceis, colaboração e amizade.

À minha família de coração no Brasil: Alejandra Zapata, Santiago Arias, Elizabeth Gonzalez, Katherine Beltrán e Jonathan Rubio, por tornar minha vida mais leve e alegre, pelo carinho, preocupação e palavras de incentivo durante este processo.

Aos meus grandes amigos, Fernando Orozco e Maria Isabel Rodríguez por estarem sempre atentos e dispostos a me escutar e aconselhar quando mais precisei.

Ao meu namorado Cesar Gonzalez por acreditar em mim e em meus sonhos, pelo amor demonstrado, felicidade oferecida, paciência, compreensão de minhas ausências, ajuda, apoio e palavras de incentivo durante este processo.

Ao CNPq pelo auxilio financeiro.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no
que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender, viver
ultrapassa qualquer entendimento”.

Clarice Lispector

RESUMO

Buchelly, Raquel Juliana Romo. **Avaliação do perfil de ácidos graxos e respostas bioquímicas de *Isochrysis galbana* sob diferentes condições fotoautotróficas, visando a produção de ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3)**. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), entre eles, o tipo ômega 3, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico(DHA) são considerados ácidos graxos essenciais para manter a saúde humana. A microalga *Isochrysis galbana* é reconhecida por sua boa qualidade nutricional e por sua capacidade de armazenar carboidratos, carotenoides e lipídios com alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, sendo avaliada como uma fonte promissora de ômega 3. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da etapa de cultivo (na fase final de crescimento e estacionária) e a otimização das condições de cultivo fotoautotróficas de *Isochrysis galbana*, variando simultaneamente três fatores: intensidade luminosa, salinidade e aeração, para produzir maiores porcentagens de PUFAs do tipo ômega 3, como o DHA , em seu perfil total de ácidos graxos, levando em conta outras respostas bioquímicas importantes como a acumulação de lipídios, concentração de biomassa e densidade celular e estudando paralelamente o efeito desses parâmetros na produção de carboidratos e pigmentos fotossintéticos. Como resultado, foi determinado que a coleta da microalga na etapa final de crescimento apresenta uma maior produtividade de biomassa de 40.37 mg/Ld, com um aumento no conteúdo do ácido graxo α linolênico (ALA, precursor dos ômega 3). Também foi encontrado que intensidades de luz sobre a saturação luminosa entre 115 – 130 μmol fotons/m^2s, salinidades altas de 47 g/L e uma vazão de ar de 2.5 vvm são as condições fotoautotróficas ideais no cultivo de *Isochrysis galbana* para alcançar uma otimização simultânea de porcentagem de DHA (12.5 %), ácidos graxos poli-insaturados tipo ômega 3 (41.6 %), concentração de biomassa (231 mg/L) e porcentagem de lipídios totais (27.28 %). A razão de poli-insaturados ômega 3/ômega 6 nas condições avaliadas variou entre 4 – 7, evidenciando o potencial da biomassa de *Isochrysis galbana* para suplemento alimentício humano ou aquicultura. As outras respostas bioquímicas de carboidratos e pigmentos fotossintéticos como clorofila A, C e carotenoides variaram segundo as condições de cultivo entre 8.3 - 15 %, 1.4 - 4.0 μg/mL, 0.4 - 1.14 μg/mL e de 1 - 2.9 μg/mL, respetivamente.

Palavras-chave: Microalga, Ômega 3, Ácidos graxos, Otimização

ABSTRACT

Buchelly, Raquel Juliana Romo. **Evaluation of fatty acid profile and biochemical responses of *Isochrysis galabana* under different photoautotrophic conditions, aiming the production of polyunsaturated fatty acids (omega 3).** Rio de Janeiro, 2015. Thesis (Master´s degree in technology of chemical and biochemical processes) – Chemical School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Omega 3-type polyunsaturated fatty acids (PUFAs), included eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are essential fatty acids for maintenance of human health. The microalgae *Isochrysis galbana* is recognized for its good nutritional quality and its ability to store carbohydrates, carotenoids and lipids with high content of polyunsaturated fatty acids, being documented as a promising source of omega 3. In this context, the aim of this work is to evaluate the growth phase (final exponential growth and stationary phase) and the optimization of photoautotrophic culture conditions of *Isochrysis galbana,* by ranging simultaneously: light intensity, salinity concentration and air flow, in order to produce higher percentages of DHA and omega 3-type PUFAs, considering other important biochemical responses, such as lipid accumulation, biomass production and cell density. At the same time, the effect of these parameters in carbohydrates and photosynthetic pigments production is assessed. As a result, it was determined that harvest of microalgae biomass in the final exponential growth phase has a higher biomass yield of 40.37 mg/Ld, with an increase in the content of alpha-linolenic fatty acid (ALA, Precursor of omega 3). Light intensity near to luminous saturation between 115-130 μmol photons/m^2s, high salinity at 47 g/L and an air flow at 2.5 vvm are the ideal conditions for the photoautotrophic culture of *Isochrysis galbana* to achieve a simultaneous optimization in the content of DHA (12.5%), omega 3-type polyunsaturated fatty acids (41.6%), total lipids (27.28%) and biomass concentration (231 mg/L). The ratio of polyunsaturated acids omega 3/omega 6, in the evaluated conditions, was maintained in 4-7, showing the potential of *Isochrysis galbana* biomass as a food supplement for humans or fish feed. Other biochemical responses as carbohydrates and photosynthetic pigments like chlorophyll A, C and carotenoids varied according to culture conditions from 8.3 to 15%, 1.4 to 4.0 μg/mL, 0.4 to 1.14 μg/mL and 1 to 2.9 μg/mL, respectively.

Keyword: Microalgae, Omega 3 fatty acids, Optimization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Denominação “ω” dos ácidos graxos poli-insaturados (A) e estrutura de: EPA C20:5 ω3 (B), DHA C22:6 ω3 (C) e AA C20:4 ω6 (D). 20

Figura 2 Cadeia trófica marinha e fontes de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. 23

Figura 3 Sistema de cultivo aberto. 31

Figura 4 Sistema de cultivo fechado tipo janela. 32

Figura 5 Cinética de crescimento característico dos microrganismos 33

Figura 6 Biossínteses dos Ácidos graxos. A numeração representa a ordem das reações. 36

Figura 7 Diagrama esquemático das rotas aeróbias para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados DHA e EPA. 39

Figura 8 Mudançãs na estrutura e fluidez da membrana sob condições de estresse a baixas e altas temperaturas. 42

Figura 9 Visualização da morfologia microscópica a 1000 X de *Isochrysis galbana* ápos 4 d de cultivo sob diferentes condições de cultivo. 45

Figura 10 Desenvolvimento do cultivo 2^3 com pontos centrais (PC). 48

Figura 11 Desenvolvimento do cultivo do desenho experimental 3^2 49

Figura 12 Cinética de crescimento de *Isochrysis galbana* sob diferentes condições de intensidade de luminosa, aeração e salinidade 57

Figura 13 Concentração de biomassa obtida no dia 6 e 10 de diferentes cultivos foto autotróficos de *Isochrysis galbana* 59

Figura 14 Diagrama de médias marginais característico para o crescimento e concentração de biomassa sob as diferentes condições de cultivo 59

Figura 15 Porcentagem de lipídios no dia 6 de cultivo 63

Figura 16 Médias marginais para lipídios no dia 6 de Cultivo 64

Figura 17 Cromatograma do perfil de ácidos graxos característico dos cultivos fotoautotróficos de *Isochrysis galbana* 65

Figura 18 Médias marginais para DHA no dia 6 de Cultivo 67

Figura 19 Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para otimização simultânea de % de DHA, poli-insaturados ômega 3, lipídios totais e concentração de biomassa para a aeração e intensidade luminosa 70

Figura 20 Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para otimização simultânea de % de DHA, poli-insaturados ômega 3, lipídios totais e concentração de biomassa para a salinidade e intensidade luminosa 70

Figura 21Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para otimização simultânea de % de DHA, poli-insaturados ômega 3, lipídios totais e concentração de biomassa para a salinidade e aeração 70

Figura 22 Cinética de crescimento de *Isochrysis galbana* sob diferentes intensidades luminosas e salinidade 72

Figura 23 Concentração de biomassa de *Isochrysis galbana* obtida sob diferentes intensidades luminosas e salinidade 73

Figura 24 Médias marginais da concentração de biomassa (mg/L) 73

Figura 25 Porcentagem de lipídios totais em *Isochrysis galbana* obtida sob diferentes intensidades luminosas e salinidade 74

Figura 26 Médias marginais de lipídios totais em Isochrysis galbana obtidas sob diferentes intensidades luminosas e salinidade 74

Figura 27 Porcentagem de carboidratos em *Isochrysis galbana* obtida sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade 78

Figura 28 Produção de Clorofila A sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade 80

Figura 29 Produção de Clorofila C sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade 80

Figura 30 Produção de Carotenóides sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade 81

Figura 31 Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para a otimização simultânea de % DHA, poli-insaturados tipo ômega 3, lipídios totais e respostas de crescimento sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade 82

Figura 32 Função otimização *Desirability* para predizer a melhor combinação de parâmetros de cultivo 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Diferentes organismos e microrganismos produtores de PUFAs e seu respetivo porcentagem de EPA/DHA no conteúdo total de lipídios. 21

Tabela 2 Lipídios obtidos em diferentes tipos de óleos de sementes e peixe. 22

Tabela 3 Classificação dos principais grupos de microalgas 25

Tabela 4 Principais produtos obtidos das microalgas e estimação do preço de mercado 29

Tabela 5 Concentração final dos componentes do meio F/2 Guillard, sem silicato, em água marinha sintética. 46

Tabela 6 Desenho experimental 2^3 com pontos centrais (PC). 47

Tabela 7 Desenho experimental 32 utilizando como fatores independentes a salinidade e a intensidade de luz. 48

Tabela 8 Variáveis de resposta no sexto e décimo dias de cultivo. 60

Tabela 9 Perfil de ácidos graxos nos dias 6 e 10 de cultivo. 62

Tabela 10 Perfil de ácidos graxos sob diferentes intensidades luminosas, salinidade e aeração. 68

Tabela 11 Perfil de ácidos graxos sob diferentes intensidades luminosas e salinidade 75

Tabela 12 Pigmentos fotossintéticos para diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade. 79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

g	grama
mg	miligrama
µg	micrograma
L	litro
mL	mililitro
°C	graus Celsius
vvm	Volume de ar por volume de meio, por minuto
rpm	rotações por minuto
d	dia
h	hora
min	minuto
s	segundo
cel	Célula
µ	velocidade específica de crescimento
Td	tempo de duplicação
X(i/f)	biomassa (inicial/final)
Px	produtividade em biomassa
FAME	éster metílico de ácido graxo (Por suas siglas em inglês)
SAFA	ácido graxo saturado (Por suas siglas em inglês)
MUFA	ácido graxo monoinsaturado (Por suas siglas em inglês)
PUFA	ácido graxo poli-insaturado (Por suas siglas em inglês)
LA	ácido linoléico (Por suas siglas em inglês)
ALA	ácido α linolênico (Por suas siglas em inglês)
EPA	ácido eicosapentaenóico (Por suas siglas em inglês)
DHA	ácido docosahexaenóico(Por suas siglas em inglês)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 OBJETIVOS 18
2.1 OBJETIVO GERAL 18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
3.1 CLASIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS E SEU BENEFÍCIO NA SAÚDE 19
3.2 FONTES DE ÔMEGA 3 21
3.3 MICROALGAS 23
3.3.1 Classificação das microalgas 25
3.3.2 *Isochrysis galbana* 25
3.3.3 Valor comercial das microalgas 27
3.4 METABOLISMO NUTRICIONAL DAS MICROALGAS 28
3.5 SISTEMAS DE CULTIVO 30
3.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS 33
3.7 LIPÍDIOS 34
3.8 SÍNTESES DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (ÔMEGA 3) 37
3.8.1 Produção de PUFA via aeróbia 38
3.8.2 Produção de PUFA via anaeróbia 40
3.9 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE ÔMEGA 3 EM MICROALGAS 40
3.9.1 Efeito da temperatura e estresse osmótico na membrana 41
3.9.2 Intensidade de luz 43
3.9.3 Aeração 43
4 MATERIAIS E MÉTODOS 45
4.1 MICRORGANISMO 45
4.2 MEIO DE CULTIVO 45
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 47
4.3.1 Primeira etapa: Identificação de uma região de curvatura no gráfico. 47
4.3.2 Segunda etapa: Desenho fatorial com triplicata 48
4.4 ANÁLISES E PROCESAMIENTO DA BIOMASSA 50

4.4.1 Obtenção da biomassa liofilizada 50
4.4.2 Avaliação de crescimento 50
4.4.3 Determinação da concentração em peso seco livre de cinzas 51
4.4.4 Pigmentos: Clorofila A, C e carotenoides. 51
4.4.5 Carboidratos totais 53
4.4.6 Lipídios Totais 54
4.4.7 Análises do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa 55
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5.1 PRIMEIRA ETAPA 57
5.1.1 Cinética de crescimento e biomassa seca 57
5.1.2 Efeito da etapa de cultivo 60
5.1.3 Lipídios totais 62
5.1.4 Perfil de ácidos graxos 64
5.1.5 Interposição de superfícies 69
5.2 SEGUNDA ETAPA 71
5.2.1 Cinética de crescimento e biomassa seca 71
5.2.2 Lipídios totais 73
5.2.3 Perfil de ácidos graxos 74
5.2.4 Outras respostas bioquimicas 77
5.2.5 Interposição de superfícies de respostas 81
6 CONCLUSÕES 84
7 TRABALHOS FUTUROS 86
8 BIBLIOGRAFIA 87

1 INTRODUÇÃO

A progressiva mudança nos hábitos alimentares nas últimas décadas, favorece o consumo de alimentos processados do tipo *fast food* (hambúrguer, pizza, batata frita, entre outros) e de óleos de sementes que apresentam um alto conteúdo de ácidos graxos saturados e PUFAs do tipo ômega 6, mas são alimentos empobrecidos em PUFAs do tipo ômega 3. Isso tem provocado uma alarmante alteração na proporção ideal de ômega 3/ômega 6 que deve estar presente no corpo. Segundo o reportado por experientes em nutrição, essa relação precisa se manter a níveis menores de 1:5, no entanto, a proporção tem aumentado entre 10 até 25 vezes a mais no ômega 6 do que no ômega 3, causando graves doenças relacionadas com problemas cardiovasculares, altos níveis de colesterol no sangue, enfermidades autoimunes, asma e câncer (Hakvag, 2012; Rubio-Rodríguez et al., 2010).

Devido ao atual contexto social e a dificuldade de alterar os hábitos alimentares na população, existe um forte interesse em incluir produtos enriquecidos com ômega 3 na dieta, destacando-se o DHA e o EPA, para retornar ao equilíbrio do corpo, utilizando óleos encapsulados e alimentos funcionais de uso diário, entre eles leite, iogurte, ovos, massa, pães, biscoitos e cereais (Conchillo, Valencia, & Puente, 2012; Coutinho et al., 2008).

A dose diária recomendada por organizações de saúde de ômega 3 (EPA e DHA) é de 430 mg/dia para as mulheres e de 667 mg/dia nos homens (Gupta, Barrow, & Puri, 2012; Lemahieu et al., 2013). Estas quantidades podem variar dependendo do estado e saúde do individuo. Aqueles com enfermidade coronária devem tomar 1 g/dia e mulheres que estão em etapa de gestação ou lactantes é recomendável tomar 200 mg/dia (Gong et al., 2014).

Na atualidade, o óleo de peixe é a principal fonte de ômega 3, mas sua utilização apresenta problemas de disponibilidade da matéria-prima, contaminação, objeção por seu sabor e odor e não aceitação por vegetarianos. Portanto, a procura de novas fontes naturais se faz necessária para suprir a demanda crescente no mercado (Gupta et al., 2012; Rubio-Rodríguez et al., 2010).

Os processos biotecnológicos usando as microalgas como microrganismos produtores de metabólitos de alto valor agregado entre eles carboidratos, carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados, lipídios e proteínas tem ganhado um campo importante na indústria.

Microalgas marinhas, como *Isochrysis galbana*, são reconhecidas como produtoras primárias das PUFAs da família ômega 3 em cultivos fotoautotróficos, podendo superar os problemas apresentados pelo uso do peixe, projetando-se como uma fonte natural promissora.

O sucesso do uso das microalgas fotoautotróficas reside na baixa exigência nutricional, alta taxa de crescimento, facilidade e reprodutibilidade do cultivo. Entretanto, uma das principais vantagens pela diversidade das espécies e sua capacidade de adaptação à diferentes condições de cultivo, é a possibilidade de direcionar o metabolismo das microalgas para o aumento na produção de um metabólito de interesse variando unicamente fatores químicos e bioquímicos do cultivo (Guihéneuf, Mimouni, Ulmann, & Tremblin, 2009).

Contribuindo nesse cenário, o laboratório de tecnologias verdes - GreenTec da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tem desenvolvido diversas pesquisas com microalgas, principalmente dulcícolas, como matéria-prima com alto potencial para a geração de biodiesel. A pesquisa do grupo abrange desde a otimização de cultivo até a obtenção e purificação do biodiesel (Hakalin, 2014; Sandoval, 2015; Viegas et al., 2015). No entanto, no grupo, também se reconhece a importância das microalgas em outras áreas biotecnológicas para um aproveitamento total da biomassa. Mesquita (2013) caracterizou bioquimicamente as microalgas marinhas *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis gracilis* e a dulcícola *Chlorella pyrenoidosa*, encontrando que estas espécies tem um bom conteúdo de proteínas, ricas em aminoácidos essenciais que poderiam ser utilizados na área de alimentos (Mesquita, 2013).

As variações nos parâmetros bioquímicos e químicos no cultivo das microalgas, como o uso de diferentes fontes de carbono, depleção de nitrogênio, intensidade luminosa, temperatura, aeração, salinidade, entre outros, tem sido amplamente estudados. Porém, se tem poucas informações do efeito simultâneo da alteração de vários parâmetros nas respostas bioquímicas e sua implicação no perfil lipídico das microalgas. Portanto, este trabalho visa pesquisar concomitantemente o efeito da salinidade, intensidade luminosa, aeração e sua interação entre fatores do cultivo fotoautotrófico na resposta da microalga marinha *Isochrysis galbana* no crescimento, acumulação de lipídios, clorofila A, C, carotenoides e perfil de ácidos graxos, procurando a melhor combinação desses parâmetros para aumentar a acumulação de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3, especialmente do DHA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de cultivo fotoautotrófico em escala de laboratório da microalga *Isochrysis galbana* para obter um perfil de ácidos graxos rico em poli-insaturados do tipo ômega 3 (especialmente DHA), avaliando simultaneamente o efeito das condições de cultivo no crescimento, acumulação de lipídios, carboidratos e pigmentos fotossintéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o potencial da microalga *Isochrysis galbana* para a produção de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3, especialmente para a produção de DHA;

- Estudar o crescimento celular e concentração de biomassa seca sob diferentes condições de salinidade, aeração e intensidade luminosa;

- Avaliar o efeito das etapas de cultivo na fase final exponencial e estacionária na produtividade de biomassa, acumulação de lipídios, o perfil de ácidos graxos e outras respostas bioquímicas;

- Determinar o efeito da salinidade e intensidade luminosa na acumulação de lipídios, clorofila A e C, carotenoides e carboidratos da microalga *Isochrysis galbana*;

- Determinar como diferentes condições de cultivo fotoautotrófico e sua interação entre fatores podem afetar o perfil de ácidos graxos da microalga *Isochrysis galbana;*

- Encontrar a melhor condição de cultivo no que se refere à salinidade, intensidade luminosa e aeração para a produção de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente para o DHA, sem afetar outras respostas importantes como acumulação de lipídios e produção de biomassa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CLASIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS E SEU BENEFÍCIO NA SAÚDE

Os ácidos graxos são definidos como ácidos carboxílicos de cadeias hidrocarbonadas que podem ter uma composição de 4 até 30 átomos de carbono. Segundo a quantidade de carbonos presentes na cadeia, eles podem ser classificados como de cadeia curta (C < 6), cadeia média (6 C – 18 C) e cadeia longa (C > 18), sendo os de cadeia média e longa (entre 12 e 24 carbonos) os mais encontrados na natureza (Lodish et al., 2003; Souza, Matsushita, & Visentainer, 1998).

Outra classificação complementar é feita com base no número de ligações duplas presentes. Denominam-se ácidos graxos saturados as cadeias hidrocarbonadas lineares que não tem duplas ligações (SAFA), e os ácidos graxos insaturados aqueles que têm uma dupla ligação, chamado também de monoinsaturado (MUFA), ou mais de duas duplas ligações separadas por um grupo metileno, conhecidos como ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (Lodish et al., 2003).

Dentre as PUFAs, se incluem as famílias dos ômega 3 (ω3) e dos ômega 6 (ω6), que diferem um do outro pela posição da primeira dupla ligação, contando a partir do carbono metil alocado na extremidade oposta ao grupo carboxílico, como é esquematizado na figura 1 (Adarme-vega, Thomas-hall, & Schenk, 2013; Rubio-Rodríguez, 2011; Wen & Chen, 2003). Assim, a representação das PUFAs é feita segundo a quantidade de carbonos presentes e o grau de instauração, junto com a família a qual pertence, por exemplo: o ácido graxo α linolênico (ALA) com 18 carbonos e três duplas ligações é o precursor dos ômega 3 e pode ser representado como C18:3 ω3 e o ácido linoléico (LA), precursor dos ômega 6 também com 18 carbonos e duas duplas ligações é representado como C18:2 ω6 (Souza et al., 1998).

As PUFAs ALA e LA, são ácidos graxos essenciais para os seres humanos, já que contribuem na saúde, mas não podem ser sintetizados completamente pelo organismo, devendo ser incluídos na dieta. Atualmente, os óleos de origem vegetal, como o óleo de soja, girassol e linhaça, são a principal fonte de LA e ALA que são supridos na alimentação, e a partir deles o organismo tem a capacidade de transformá-los em PUFAs de cadeia longa ômega 6, como ácido araquidônico (C20:4 AA) e ômega 3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5) e docosahexaenóico (DHA C22:6) (figura 1).

No entanto, nos eucariotos superiores é apresentada uma baixa eficiência de conversão das cadeias longas de ômega 3, de aproximadamente 5 % para EPA e menor que 0.5 % para o DHA, cuja eficiência ainda decresce com a idade (Citadin, 2007; Gong et al., 2014). Isto contribui a uma maior acumulação no corpo de PUFAs ômega 6 com respeito as PUFAs ômega 3, o que prejudica a saúde e qualidade de vida das pessoas, pelo qual o EPA e DHA são também considerados como ácidos graxos essenciais e devem ser inclusos na dieta.

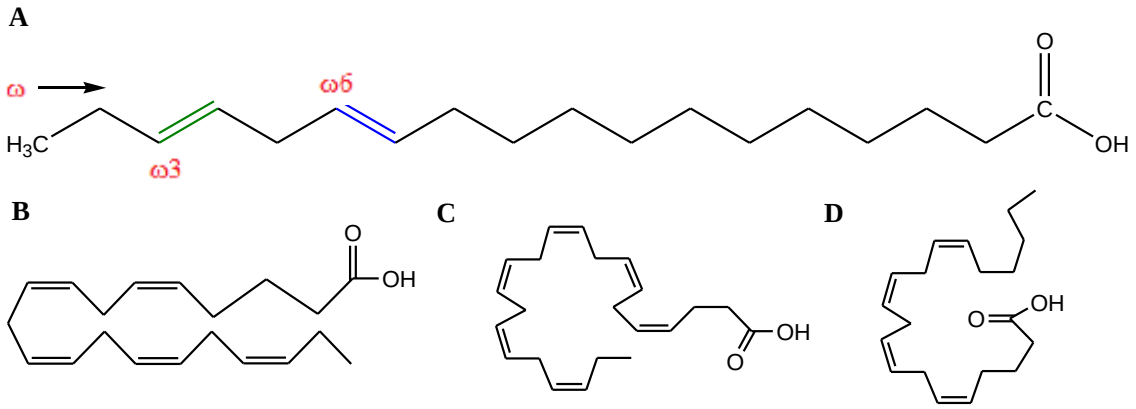


Figura 1 Denominação "ω" dos ácidos graxos poli-insaturados (A) e estrutura de: EPA C20:5 ω3 (B), DHA C22:6 ω3 (C) e AA C20:4 ω6 (D).

Adaptado (de Jesus Raposo, de Morais, & de Morais, 2013)

A partir dos anos 1950 e 1960, são conhecidas as primeiras informações sobre a identificação do DHA no óleo de peixe e os benefícios das PUFAs do tipo ômega 3 na saúde cardiovascular descritos pelo professor Norueguês Notervap. A partir desse momento, inúmeras pesquisas clínicas foram realizadas, e hoje em dia não se tem dúvidas da importância da ingestão destas PUFAs, destacando-se o DHA e EPA, para prevenir e tratar diversas doenças (Hakvag, 2012).

Especificamente, o EPA é associado com a saúde cardiovascular, anti-inflamatório e usado para tratamentos de doenças, como aterosclerose e certos tipos de câncer e o DHA é geralmente utilizado para melhorar o desenvolvimento do cérebro e sistema visual em crianças nos primeiros dois anos de vida. Devido a que este ácido graxo é um componente essencial nas células neuronais, é usado também no tratamento para prevenção do Alzheimer (Lemahieu et al., 2013; Martins, Piotto, & Barbosa, 2008; Talab, Ardjmand, Motallebi, & Pourgholam, 2010).

3.2 FONTES DE ÔMEGA 3

Os ômega 3 de cadeia longa podem ser encontrados de forma natural em microrganismos marinhos de águas frias e profundas como microalgas, bactérias e fungos, e em animais como peixes e caranguejos. Por outro lado, as plantas superiores não tem a capacidade de sintetizar PUFAs de cadeias longa, mas devido ao avanço na área molecular, elas são modificadas geneticamente para produzi-las (tabela 1 e 2) (Adarme-vega et al., 2013; Cao, Cao, & Zhao, 2012).

Tabela 1 Diferentes organismos e microrganismos produtores de PUFAs e seu respetivo porcentagem de EPA/DHA no conteúdo total de lipídios.

Bactérias		Fungos	
Organismo	***%***	***Organismo***	***%***
Shewanella putrefaciens	40.0 EPA	*Thraustochytrium aureum*	62.9 EPA +DHA
Alteromonas putrefaciens	24.0 EPA	*Mortierella*	13-20 EPA
Pneumatophorus japonicus	36.3 EPA	*Pythium*	12 EPA
Photobacterium	4.6 EPA	*Pythium irregulare*	8.2 EPA
Plantas transgênicas		**Microalgas**	
Organismo	***%***	***Organismo***	***%***
Glixine max (Soja)	20.0 EPA	*Nannochloropsis sp.*	26 EPA+DHA
Brassica carinata (Mostarda-da-abissínia)	25.0 EPA	*Thraustochytrium sp.*	45.1 EPA+DHA
*Nicotiana benthamiana (*Tabaco)	26.0 EPA	*Chlorella minutissima*	39.9 EPA
		Pavlova lutheri	27.7 EPA+DHA
		Isochrysis galbana	28 EPA+DHA

Adaptado de (Adarme-vega et al., 2012)

Atualmente, o mercado mundial de ômega 3 é liderado pela venda de óleo de peixe, extraído principalmente do salmão, sardinha, cavala e bacalhau que em sua composição de ácidos graxos totais, têm um conteúdo superior de ômega 3 do que de ômega 6 (Gupta et al., 2012). Essa composição pode ser observada na tabela 2, onde são comparados os lipídios de diferentes tipos de óleo de peixe e sementes.

Um dos maiores problemas que tem essa matéria-prima é a sustentabilidade, já que sua alta demanda no mercado compromete cada vez mais sua disponibilidade para os fins de extração e concentração dos ômegas. Além disso, os óleos extraídos de peixes têm outros problemas que afetam a qualidade e custo do produto, como baixa estabilidade oxidativa, alta contaminação com metais pesados (mercúrio e cobre), toxinas, variação na composição de

PUFAs, objeção em seu consumo por vegetarianos e como consequência de seu sabor e odor, o produto deve passar por um processo de desodorização, aumentando os custos de produção e elevando o preço no mercado (Atalah, Cruz, Izquierdo, Rosenlund, & Caballero, 2007; Lemahieu et al., 2013; Martins et al., 2008). Portanto, novas fontes competitivas de ômega 3 de boa qualidade e baixo custo de geração devem ser encontradas para suprir a crescente demanda no mercado de alimentos funcionais.

Tabela 2 Lipídios obtidos em diferentes tipos de óleos de sementes e peixe.

Óleo	Saturado	Monoinsaturados	Poli-insaturados	ω3	ω6	ω3/ω6
Girassol	12.00	20.50	67.50	0.1	63.20	< 0.01
Milho	14.50	29.90	55.60	0.90	50.40	0.02
Soja	15.60	21.20	63.20	7.30	51.50	0.14
Palma	47.80	37.10	15.10	0.30	10.10	0.03
Olive	14.30	73.00	12.70	0.70	7.80	0.09
Fígado de bacalhau	22.60	20.70	56.80	19.80	0.90	22.00
Salmão	19.90	17.00	63.10	35.30	1.060	33.30
Sardinha	30.40	14.50	55.10	28.10	2.20	12.77

Fonte: (Rubio-Rodríguez et al., 2010).

As microalgas marinhas, como as espécies de dinoflagelados e de diatomáceas, são as produtoras primarias de grandes quantidades de PUFAs do tipo ômega 3, e por cadeia alimentar é transferida aos outros organismos no mar aberto (Hamilton, Haslam, Napier, & Sayanova, 2014). Devido a isto e ao fornecimento de outros nutrientes importantes, as microalgas têm sido utilizadas há muito tempo na aquicultura como alimento de peixes e crustáceos nas primeiras etapas de crescimento (Roy & Pal, 2014). Na figura 2 é ilustrada a cadeia trófica marinha e as diferentes fontes de ácidos graxos da família ômega 3.

Conchillo *et al.* (2012) determinaram que o óleo obtido das microalgas tem quantidades similares de ômega 3 ao óleo de peixe, com a vantagem de possuir três vezes menos colesterol e maior quantidade de esqualeno e fitosteróis, substâncias que também geram efeitos benéficos para a saúde. Comparada com os óleos de peixes, o óleo extraído das microalgas também apresentam dificuldades por sua baixa estabilidade oxidativa e odor desagradável que são desafios que tem que ser superados.

Em adição, o cultivo de microalga é de fácil manipulação e existem espécies específicas produtoras de um só tipo de PUFA, o que facilita a purificação dos ômegas 3

essenciais. Também, apresenta uma taxa de crescimento alta e não tem problemas com sazonalidades, aumentando a produtividade dos ômegas 3 na escala industrial (Bianchini, Silvana, Maurício, & Bibliográfica, 2006). Comparadas com os fungos e bactérias, as microalgas podem produzir duas vezes mais ácidos graxos poli-insaturados (Gupta et al., 2012).

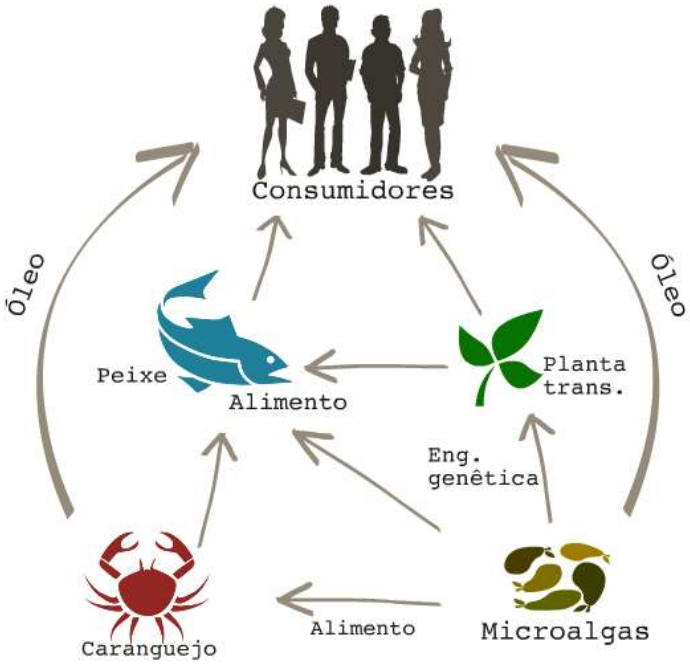


Figura 2 Cadeia trófica marinha e fontes de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3.

Fonte: (Adarme-vega et al., 2013)

Pelo exposto anteriormente, as microalgas são consideradas como fontes altamente promissoras de ômega 3, tornando-se foco de muitas pesquisas em engenharia bioquímica e genética com a finalidade de incrementar a produção de poli-insaturados, modificando as condições de cultivo ou utilizando seus genes relacionados com sua sínteses para transferi-los a outros microrganismos não produtores que sejam de fácil manipulação genética (Gupta et al., 2012).

3.3 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos fotossintéticos oxigênicos altamente diversos em sua taxonomia, que apresentam como pigmento principal a clorofila A, e secundários ou também chamados pigmentos acessórios como a clorofila B, C, D e carotenoides (Lourenço, 2006; Mesquita, 2013). A maioria delas são unicelulares, tanto eucariotas quanto procariotas (cianobactérias), encontradas principalmente livres em ambientes aquáticos marinhos e de

água doce, mas também estão presentes no solo e no ar (Tomaselli, Masojídek, Lee, Vonshak, & Molina, 2004).

Até o momento, perto de 35.000 espécies de microalgas tem sido descritas na literatura, mas estima-se que existam entre 200.000 e 800.000, constituindo a maior proporção das espécies das algas (Bianchini et al., 2006). O tamanho das microalgas varia entre 2 - 200 μm, elas podem, ou não, apresentar motilidade e a grande maioria segue hábitos planctônicos, constituindo a base de alimento dos ecossistemas aquáticos (Lourenço, 2006; Sieburth, Smetacek, & Lenz, 1978).

Apesar de exibir um metabolismo fotossintético e acumularem substâncias semelhantes às plantas, as microalgas possuem uma maquinaria fotossintética 10 vezes mais eficiente na transferência de massa e na geração de biomassa, por apresentarem uma estrutura celular simples que permite converter facilmente a energia solar em energia química, e estão em contato direto com os nutrientes inorgânicos submersos na água necessários para seu crescimento (Chauton, Reitan, Norsker, Tveterås, & Kleivdal, 2015; Ratha & Prasanna, 2012).

A elevada capacidade de fixar CO_2 durante a fotossíntese através do ciclo do carbono torna as microalgas responsáveis pela fixação de mais de 50 % do carbono orgânico global, produzindo por sua vez, efluentes altamente oxigenados pela liberação de O_2 (Milledge, 2011; Ratha & Prasanna, 2012; Theresia, Thomas, & Klaus D, 2012).

Em comparação com as plantas, as microalgas apresentam certas vantagens, como:

- Duplicação de células em um curto período de tempo, gerando uma elevada produtividade anual de biomassa;
- Não precisam de terras aráveis para seu cultivo, portanto não são dependentes de sazonalidades e não competem com o uso destas terras para fins alimentícios;
- São considerados microrganismos de baixa exigência nutricional, o que permite utilizar meios de cultivo econômicos ou efluentes agroindustriais para seu crescimento;
- Apresentam um menor consumo de agua que as plantas superiores;
- Possuem uma maior quantidade de ácidos graxos com cadeias superiores a 18 C;
- Suportam amplas condições ambientais de temperatura, pH e salinidade.

Diante de tantas vantagens, o cultivo das microalgas tem chamado a atenção de pesquisadores e empresários, que consideram este microrganismo uma fábrica biológica com um grande potencial para seu uso econômico industrial (Bianchini et al., 2006; Coutinho et al., 2008; Ratha & Prasanna, 2012).

3.3.1 Classificação das microalgas

Conforme Tomaselli *et al*. (2004), as algas e microalgas são tradicionalmente classificadas com base em seus pigmentos fotossintéticos, natureza química de sua reserva energética e pela composição da sua parede celular. Além disso, para sua classificação são consideradas características morfológicas da célula (Guschina & Harwood, 2006). Na tabela 3 é listada a classificação dos principais grupos de microalgas.

Tabela 3 Classificação dos principais grupos de microalgas

Grupo	Tipo de clorofila	Pigmento acessório	Substância de reserva	Componentes da parede celular
Chlorophyta (Algas verdes)	A,B	Carotenos e Xantofilas	Amido e lipídios	Celulose
Phaeophyta (Algas marrons)	A,C	Carotenos e Xantofilas (Ficoxantina)	Laminaria	Celulose e algina
Rhodophyta (Algas vermelhas)	A,D	Ficocianina e ficoeritrina	Amido das florídeas	Celulose e pectinas
Chrysophyta (Algas douradas)	A,C1-2	Fucoxantina	Crisolaminarina	Celulose e sílica
Prymnesiophyta (Haptophyta)	A,C1-2	Carotenos e Fucoxantinas	Crisolaminarina	Não possuem parede celular
Euglenophyta (Euglenóides)	A,B	Carotenos e xantofilas	Paramilo	Não possuem parede celular
Dinophyta (Dinoflegelados)	A,C	Carotenos e xantofilas	Amido e lipídios	Celulose ou sem parede celular

Adaptado de: (Sandoval, 2015; Tomaselli et al., 2004)

Dentre as espécies de microalgas reconhecidas como produtoras de PUFAs da família ômega 3 estão as Prymnesiophyta *Isochrysis sp*. e *Pavlova lutheri*, as Bacillariophyceae *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira* spp. e a Dinophyta *Crypthecodinium cohnii*.

3.3.2 Isochrysis galbana

Isochrysis galbana é uma microalga marinha marrom-dourada unicelular, que possui uma estrutura filamentosa de orientação nomeada haptonema, alocada entre dois flagelos de igual tamanho (aproximadamente 7 µm), os quais permitem sua movimentação no meio (Liu

& Lin, 2001). Sua forma pode ser elíptica ou esférica, com 5 - 6 µm de comprimento, 2 - 4 µm de largura, 2.5 - 3 µm de espessura e volume de 58 - 80 μm^3, muito menor que o volume de outros tipos de microalgas como *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis gracilis,* que apresentam um volume de 667 e 769 μm^3, respetivamente (Campos & Barbarino, 2010; Lin, Chang, Tsao, & Leu, 2007). Como consequência de seu pequeno tamanho e volume fazem parte do nanoplacton (Mesquita, 2013).

Estruturalmente, não apresentam parede celular, apenas possuem um revestimento de membrana plasmática e plastídios rodeados de três membranas. Esta microalga armazena lipídios em grânulos denominados corpos lipídicos, onde cada célula pode produzir entre 3 e 7 grânulos (Liu & Lin, 2001). Reporta-se que na fase de crescimento exponencial e estacionária, *Isochrysis galbana* acumula entre 19 – 30 % de lipídios em relação a sua biomassa seca.

Segundo Pulz e Gross (2004) e Marchetti *et al.* (2012), *Isochrysis* sp. pode ser cultivada em processos indoor e outdoor, principalmente para fins de aquicultura na alimentação direta de larvas de crustáceos, moluscos e peixes devido as suas características nutritivas, onde é ressaltado seu alto conteúdo de PUFAs tipo ômega 3, ácido ascórbico e sua fácil assimilação (van Bergeijk, Salas-Leiton, & Cañavate, 2010).

Na literatura, são descritas duas cepas de *Isochrysis galbana* que são geralmente utilizadas, *Isochrysis galbana* clone T-ISSO e *Isochrysis galbana* Parke, que apresentam algumas diferenças entre si. T-ISSO possui uma capacidade maior de se adaptar a um amplo intervalo de temperatura e intensidade luminosa, apresentando um crescimento ótimo a temperaturas de 27 - 28 °C. Entretanto, nessa temperatura, Parke sofre limitações em seu crescimento, já que sua temperatura ótima de cultivo é 20 °C (Grima, Srinchez, Siinchez, Camachoa, & Alonsob, 1992). Não obstante, a principal diferença entre elas está na composição do perfil lipídico. *Isochrysis galbana* clone T-ISSO pode acumular quantidades significativas só de DHA e *Isochrysis galbana* Parke apresenta simultaneamente a acumulação de EPA - DHA (Yoshioka, Yago, Yoshie-Stark, Arakawa, & Morinaga, 2012).

Os pigmentos fotossintéticos deste grupo de microalgas presentes nos cloroplastos das células incluem clorofila a, clorofila c1, clorofila c2 e carotenoides, principalmente xantofilas, que são pigmentos amarelo-dourados como fucoxantina (o mais abundante nela), também tem

β-caroteno, diadinoxantina, diatoxantina e outros derivados da fucoxantina (Berger, Liaaen-jensen, Mcalister, & Guillard, 1977).

3.3.3 Valor comercial das microalgas

Nos últimos anos, um dos grandes objetivos de estudo do cultivo das microalgas a nível mundial foi direcionado à produção de lipídios para a geração de biodiesel como uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis (Nwokoagbara, Olaleye, & Wang, 2015; Zhao, Yu, Li, Tang, & Huang, 2014). Até o momento, a produção do biodiesel de terceira geração, como também é chamada, é avaliada como tecnicamente possível, mas ainda não é tecnicamente econômica, sendo o aperfeiçoamento do processo um desafio a ser superado.

Por causa da heterogeneidade das microalgas e sua capacidade de estocar uma quantidade ilimitada de produtos de interesse comercial, poderia se pensar num aproveitamento integral da biomassa (biorrefinaria), visando ter uma maior viabilidade econômica em aplicações nas indústrias de biocombustíveis, farmacêutica, de cosméticos e de alimentos para humanos e animais (Sahu et al., 2013; Sibi, Shetty, & Mokashi, 2015).

Pulz (2001), cita que entre os produtos obtidos de macro e microalgas a nível mundial, gera-se um retorno de USD 5* 10^9/ano. A produção de biomassa microalgal anual é aproximadamente de 5000 ton e produz um retorno de USD 1.25* 10^9/ano (Otto Pulz & Gross, 2004).

Na tabela 4 são relatados os dados dos principais produtos obtidos das microalgas e seu preço no mercado. Nota-se que o β caroteno, a astaxantina e os ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o DHA, são os produtos com maior valor agregado. Conforme dito por Harwood e Guschina (2009) o DHA obtido de microalga é comercializado pela empresa Martek em mais de 60 países.

Segundo o reporte de mercado feito pela companhia Packaged Facts, a venda global de produtos enriquecidos com ômega 3 (EPA/DHA) obtidos de óleo de peixe, microalgas e outras fontes produtoras, deixou $ 25.42 bilhões em 2011 e estimam que alcance os $34.7 bilhões em 2016, gerando uma grande expectativa de investimento e crescimento neste produto (Facts, 2012).

O mercado da maioria dos produtos obtidos das microalgas ainda está na sua fase de desenvolvimento exponencial. Grande parte das empresas consolidadas estão situadas nos

Estados Unidos. Entretanto, algumas outras estão estabelecidas na Alemanha, Israel, China e Japão (Otto Pulz & Gross, 2004; Rosenberg, Oyler, Wilkinson, & Betenbaugh, 2008). No Brasil, não se tem relatos de produção de biomassa de microalga em grande escala, só são apresentadas algumas poucas empresas em escala piloto, como a Algae Biotecnologia, dedicadas ao design e implantação de cultivo de microalgas para o tratamento de efluentes e o aproveitamento da biomassa, especialmente em aplicações de aquicultura e pesquisa (Bianchini et al., 2006).

3.4 METABOLISMO NUTRICIONAL DAS MICROALGAS

As microalgas dependem muito da disponibilidade da fonte de carbono e de luz para realizar a fotossíntese e produzir a energia necessária para seu crescimento e síntese de compostos primários. Geralmente elas são cultivadas em condições foto-autotróficas, utilizando a luz solar ou artificial como fonte exclusiva de energia e o carbono inorgânico, por exemplo o CO_2 contido no ar, como fonte de carbono (Tomaselli et al., 2004).

Industrialmente, o cultivo foto-autótrofico em processos descontínuos são os mais utilizados para a produção de biomassa algacea, por sua viabilidade econômica e contribuição ambiental, devido ao uso do CO_2 proveniente do efeito estufa que pode estar acoplado ao tratamento terciário de águas residuais com quantidades elevadas de macronutrientes, como nitrogênio e fosforo (González, 2006).

Entretanto, as principais limitações deste cultivo são a inibição do crescimento pelo auto-sombreamento entre as células, as quais não permitem um aproveitamento total da energia luminosa, e o suprimento insuficiente de CO_2, já que no ar o CO_2 esta em uma porcentagem muito baixa de 0.036 % (Bianchini, 2006; Wen & Chen, 2003). Nestas condições de cultivo a concentração de biomassa não supera os 2 g/L.

Embora o metabolismo fotoautotrófico seja muito utilizado pelas microalgas, existem espécies que podem modificar seu metabolismo para crescer utilizando carbono orgânico como única fonte de carbono e energia, empregando substratos como a glucose, sacarose ou ácidos orgânicos na ausência de energia luminosa. Este tipo de cultivo é denominado heterotrófico e gera concentrações superiores de biomassa comparada com os cultivos fotoautotóficos, superando os problemas de auto-sombreamento (Hakalin, 2014; Wen & Chen, 2003). Porém, o uso de fontes de carbono como açúcares puros torna o processo

Tabela 4 Principais produtos obtidos das microalgas e estimação do preço de mercado

Produto		Aplicações	Valor de mercado (USD *10^6/ano)	Preço (USD)	Microalgas
Biomassa	Biomassa	Alimentos saudáveis	1200 - 2500	50/kg	*, Chlorella vulgari, Arthrospira platensis*
		Alimentos funcionais	800	-	*Isochrysis galbana, Nannochloropsis*
		Complemento alimentar	300	-	*Spirulina, Chlorella, Chlamydomonas*
		Aquacultura	700	70/L	*Isochrysis galbana, Nannochloropsis*
		Biocombustíveis	-	-	*Chlorella vulgaris,Dunaliella*
		Condicionador do solo	-	-	-
Corantes e antioxidantes	Xantofilas (Astaxantina e cantaxantina)	Cosméticos	‹150	10000/Kg	*Haematococcus*
	Luteina		-	-	*Muriellopsis sp*
	Beta- caroteno		›280	300 - 3000/kg	*Dunaliella salina*
	Vitamina C e E		-	-	-
Ácidos graxos	Ácido araquidônico (ARA)	Complemento alimentar, Alimentos funcionais	20	60/g	-
	Ácido ecosapentaenoico (EPA)		-		*Nannochloropsis, Chl. minutissima*
	Ácido gama linolênico (GCA)		-		-
	Ácido docosahexaenoico (DHA)		1500		*Crypthecodium cohnii, Isochrysis sp*
	Ácido linolênico (ALA)		-		
Enzimas	Superóxido dismutase (SOD)	Pesquisa	-	-	*Anabaena*
	Fosfoglicerato quinase (PGK)	Medicina			
	Lucierase e luciferína				
	Enzimas de restição				
Polímeros	Polissacarídeos	Aditivos alimentares	-	-	*Porphyridium cruentum*
	Amido	Cosméticos			-
	Ácido poli beta hidroxibutirico PHB	Medicina			-
Produtos especiais	Peptídeos		-	-	-
	toxinas	Pesquisa	1 3		
	Isótopos	Medicina	›5		
	Aminoácidos (Prolina, arginina, Ac.aspártico)		-		
	Esteróis		-		

Adaptado de: (Bianchini et al., 2006; Otto Pulz & Gross, 2004; Ratha & Prasanna, 2012; Rosenberg et al., 2008)

mais suscetível a contaminação, devido ao fato de microrganismos, como as bactérias, serem consumidores destes substratos (Adarme-vega et al., 2012).

Finalmente, no metabolismo mixotrófico, as microalgas utilizam as propriedades do cultivo fotoautotrófico e heterotrófico, em outras palavras, elas usam simultaneamente fontes de carbono orgânico e inorgânico e aproveitam a luz junto com o carbono orgânico como fonte de energia (Guihéneuf et al., 2009).

No entanto, nem todas as espécies de microalga mostram a capacidade de assimilar uma fonte de carbono por um processo que seja diferente da fotossíntese. Vazhappilly e Chen (1998) avaliaram a capacidade de 20 espécies de microalgas produtoras de DHA e/ou EPA de crescer em cultivos heterotróficos com glucose e acetato. *Crypthecodinium cohnii* UTEX L1649 mostrou um excelente crescimento e produção de DHA em cultivo heterotrófico, especialmente quando a fonte de carbono é glucose; *Amphidinium* sp. CSIRO CS-259 e *Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209 mostraram um bom crescimento para as duas condições heterotróficas testadas. Entretanto, microalgas como *Chlorella minutissima* UTEX 2219, *Pavlova lutheri* UTEX LB 1293 e *Isochrysis galbana* UTEX LB 987 cresceram pobremente nestas condições, precisando de mais de 20 dias de cultivo para obter uma quantidade considerável de biomassa e a espécie *Nannochloropsis oculata* UTEX LB 2164 foi à única microalga que não apresentou crescimento nenhum em heterotrofia, considerando-se estritamente fotoautotrófica (Vazhappilly & Chen, 1998).

Em condições autótroficas, *Phaeodactylum tricornutum* e *Nannochloropsis sp* pode alcançar um conteúdo de EPA de 39 % do total de ácidos graxos (Adarme-vega et al., 2013). Atualmente, *Crypthecodinium cohnii* é a única espécie de microalga utilizada comercialmente para a produção de DHA em condições heterotróficas, usada principalmente em fórmulas de leite infantil (Bergé & Barnathan, 2005; Milledge, 2011).

3.5 SISTEMAS DE CULTIVO

O cultivo de microalgas em grande escala pode ser feito em sistemas de tanques abertos ou fechados, denominados foto-biorreatores (Figuras 3 e 4) (van Bergeijk et al., 2010).

O tanque aberto é o sistema de cultivo mais simples e antigo utilizado na geração de biomassa de microalgas. Nele, o cultivo é exposto ao meio ambiente, aproveitando a iluminação e temperatura natural (O Pulz, 2001; Wen & Chen, 2003). Os sistemas artificiais,

denominados “raceways” e as lagoas naturais, são os principais representantes destes sistemas empregados na escala industrial (Hakalin, 2014; Richmond & Cheng-Wu, 2001).

Figura 3 Sistema de cultivo aberto.

Foto: Grupo GREENTEC, Universidade Federal de Rio de Janeiro.

Os cultivos abertos apresentam fácil escalonamento e baixo custo de construção devido à utilização de materiais econômicos, como o concreto, a fibra de vidro ou materiais plásticos que suportem uma agitação constante para garantir a homogeneidade do cultivo.

Entretanto, a maior desvantagem desse sistema é a alta contaminação com bactérias ou outras espécies indesejáveis de microalgas e protozoários que consomem a biomassa gerada. Outras desvantagens são a falta de controle na temperatura, a grande evaporação de água e problemas de transferência de nutrientes. Como consequência, é gerada uma biomassa de qualidade variável entre cada batelada e são atingidas produtividades de biomassa que podem variar dentre 0.05 até 0.5 g/Ld, no máximo (Howard, Abotsi, L, & Howard, 2003; van Bergeijk et al., 2010). Assim, os sistemas de tanques abertos são competentes para desenvolver cultivos fotoautotróficos para fins de aquicultura ou no uso de espécies de microalgas extremófilas, cujas condições seletivas ambientais diminuem o risco de contaminação do cultivo (O Pulz, 2001; Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2013).

Por outra parte, os sistemas fechados são equipamentos específicos que possibilitam um maior controle do processo, tanto que os habilitam nos cultivos para fins farmacêuticos, já que se pode garantir a reprodutibilidade das condições de cultivo. Seu isolamento do meio ambiente favorece a diminuição da contaminação e evaporação da água. Contudo, este sistema tem um custo de construção superior ao apresentado pelos sistemas abertos, já que utiliza materiais transparentes, como vidro ou policarbonato, que são muito caros (Rawat et al., 2013).

Existem diferentes tipos de arranjos de foto-biorreatores, que são otimizados em sua geometria para alcançarem uma maior área de incidência de luz (natural ou artificial) e terem melhores condições de fluxo, visando o aumento da biomassa até níveis de 2 - 8 g/L (Chauton et al., 2015; O Pulz, 2001). Dentre os foto-biorreatores mais usados estão os tubulares inclinados, horizontais e de placas paralelas. (Abyor, Ariyanti, & Hadiyanto, 2011; Ratha & Prasanna, 2012).

Embora todas as dificuldades apresentadas pelos cultivos em tanques abertos, que foram expostas anteriormente, hoje em dia, são os sistemas mais usados industrialmente a nível mundial, representando 95 % do total da produção de biomassa.

Figura 4 Sistema de cultivo fechado tipo janela.

Foto: Grupo GREENTEC, Universidade Federal de Rio de Janeiro.

Pesquisas em escala de laboratório são importantes como uma etapa prévia ao escalonamento de bio-processos. Esta fase é necessária para estudar o efeito de distintos

parâmetros no comportamento da espécie de microalga e conseguir aperfeiçoar as condições de cultivo visando melhorar a produção de biomassa e de bioprodutos. Desta forma, com uma base experimental é mais confiável ter um aumento de escala satisfatório até a escala industrial.

3.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

De forma semelhante a outros tipos de microrganismos, as microalgas desenvolvem uma curva típica de crescimento que relaciona o incremento da densidade celular com respeito ao tempo de cultivo. Num cultivo descontínuo ou batch, onde os nutrientes são adicionados só na etapa inicial do cultivo, a curva característica está composta por quatro fases de crescimento: lag ou de adaptação, exponencial, estacionária e de morte celular (figura 5) (Madigan, Martinko, & Brock, 2004; Xu & Boeing, 2014).

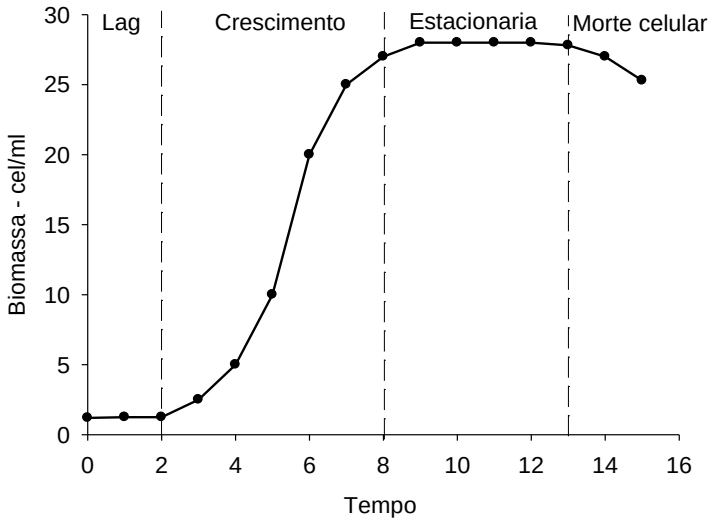


Figura 5 Cinética de crescimento característico dos microrganismos

Fase lag: Nesta fase acontece a adaptação fisiológica das microalgas a um novo meio de cultivo com condições diferentes ao anterior do qual elas são provenientes. Nesta etapa, não existe um aumento de biomassa ou duplicação celular (taxa de crescimento $\mu = 0$), já que a energia produzida é usada pelas células em seu metabolismo celular para a síntese de proteínas e enzimas necessárias para sobrevivência e posterior crescimento. O tempo de adaptação varia dependendo da quantidade e capacidade do inoculo em responder positivamente a variação das condições de cultivo.

Fase de crescimento: No momento que a adaptação da microalga termina, começa a etapa de crescimento exponencial, onde as células estão mais jovens e ativas. Aqui, a

duplicação celular acontece em intervalos regulares de tempo, apresentando uma taxa de crescimento máxima constante. As microalgas só diminuem sua duplicação quando algum nutriente indispensável é esgotado no meio, ou quando é restringida a penetração de luz no cultivo, limitando o crescimento continuo e entrando na etapa estacionária (Madigan et al., 2004).

Fase estacionária: Nesta fase é alcançada a máxima densidade celular. A duplicação celular praticamente é nula e as microalgas começam a estocar energia em compostos de alto valor energético, como os triacilgliceróis (Tomaselli et al., 2004).

Fase de morte celular: É a fase final do cultivo. A morte celular é alcançada quando se chega ao esgotamento dos próprios compostos de armazenamento de energia das células, afetando a qualidade do cultivo e diminuindo a densidade celular.

A composição bioquímica, tipos de lipídeos e perfil de ácidos graxos da biomassa varia segundo a etapa na qual é coletada a microalga (Liu & Lin, 2001). Bianchiini (2006) realizou uma análise bioquímica da biomassa das microalgas diatomáceas *T.fluviatilis* e *C. muelleri* cultivadas com diferentes fontes de carbono e recolhidas em diferentes etapas de cultivo. Ele encontrou que a quantidade de lipídios e perfil de ácidos graxos são afetados pela espécie, fase de cultivo, fonte de carbono e interação entre fatores, reportando uma maior quantidade de lipídios na etapa estacionária (Bianchini, 2006).

Hamilton (2014) determinou que a microalga *Phaeodactylum tricornutum* tem um perfil de ácidos graxos com maior conteúdo de EPA na fase exponencial que na fase estacionária, contrário à acumulação do ácido palmitoleico (C16:1) que apresentou uma maior porcentagem na fase estacionária. Tem se reportado que na etapa de crescimento é o momento em que as microalgas geram mais PUFA (lipidos polares) e na fase estacionária tardia diminuem este conteúdo, aumentando a acumulação de lipídios de reserva energética, como os triacilgliceróis (Theresia et al., 2012).

3.7 LIPÍDIOS

O termo lipídio é usado para determinar um conjunto de biomoléculas que possuem grande variedade estrutural e insolubilidade em água; no entanto, exibem como característica comum uma alta solubilidade em solventes orgânicos como o clorofórmio, éter, metanol, hexano, entre outros. Aproveitando esta característica, o principal método de extração dos

lipídios totais presentes na biomassa de microalgas é baseado no uso de solventes (Bligh & Dyer, 1959; Tang, Qin, Wang, Li, & Tian, 2011).

A composição de lipídios totais nas microalgas se divide em duas frações, as saponificáveis e insaponificáveis, que são diferenciadas entre si pela reação que acontece na presença ou ausência dos ácidos graxos, respectivamente (Viegas et al., 2015). Entre os lipídios saponificáveis estão os triacilgliceróis, fosfolipídios e glicolipídios e dentre os lipídios insaponificáveis estão os carotenoides, clorofilas e esteróis. Os lipídios com ácidos graxos fazem parte da maior proporção do conteúdo total de lipídios obtidos da biomassa microalgal (Hakalin, 2014).

A biossíntese de ácidos graxos nas microalgas fotoautotróficas é gerada com base na fonte de carbono inorgânico através da fotossíntese (He, Yang, Wu, & Hu, 2015). A catálise é constituída por três etapas consecutivas: a primeira é a síntese da acetil coenzima A, a segunda é a formação de ácidos graxos saturados de 16-18 C, adicionalmente esses ácidos podem ou não ser submetidos a uma elongação e dessaturação da cadeia, e a terceira etapa é a síntese dos lipídios simples ou complexos (Pereira et al., 2013).

O gliceraldeido fostato (GAP) é o mediador chave para a síntese do material de origem dos ácidos graxos, o Acetil CoA(He et al., 2015). O GAP é um produto intermediário obtido do processo fotossintético que é desenvolvido nos cloroplastos e inclui diversas reações na fase clara para a produção de energia e o desenvolvimento do ciclo de Calvin (He et al., 2015; Yang, Hua, & Shimizu, 2000). Alternativamente, o GAP pode ser usado na produção de carboidratos e proteínas, mas, para fins de produção de lipídios, esse intermediário é oxidado na via glicolítica até piruvato para a posterior formação de Acetil CoA.

A biossíntese dos ácidos graxos é mediada por duas enzimas importantes: a acetil CoA carboxilase (ACC), que cumpre uma função de controle do processo e o complexo ácido graxo sintase (AGS), formado por seis enzimas e uma proteína carregadora de acilas (ACP), encarregado da elongação da cadeia (Pereira et al., 2013).

No primeiro passo da síntese, o Acetil CoA reage com o CO_2 pela ação da ACC para formar o malonil CoA. Posteriormente, o malonil é unido á proteína ACP, liberando a coenzima A para sintetizar o malonil-ACP, reação provocada pela enzima malonil CoA-ACP transcilase, que pertence ao complexo AGS. A partir daqui é iniciado o primeiro ciclo de

alongamento da cadeia com blocos de dois carbonos, obtidos do acetil-ACP e a atuação do complexo AGS (Madigan et al., 2004).

Tanto o malonil-ACP e o Acetil-ACP são usados como substrato e condensados para produzir o β ceto acetil, molécula que sofre duas reduções e uma desidratação para finalmente gerar como produto de quatro carbonos o Butiril-ACP, o qual entra em um novo ciclo de elongações até gerar uma cadeia final com 16 – 18 C saturados (figura 6).

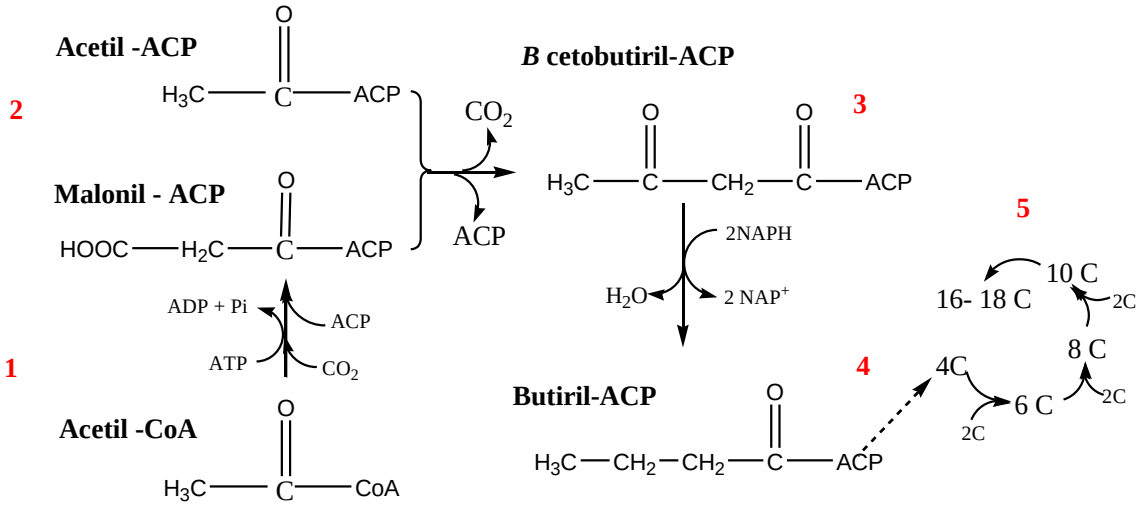


Figura 6 Biossínteses dos Ácidos graxos. A numeração representa a ordem das reações.

Adaptado de:(Madigan et al., 2004)

Nas células, os ácidos graxos podem estar unidos por seu grupo carboxílico a outro composto orgânico, como o glicerol, formando moléculas lipídicas simples, entre eles os acil gliceróis (triglicerói s) ou moléculas complexas, por exemplo os fosfolipídios (Madigan et al., 2004; Martins et al., 2008; Rubio-Rodríguez et al., 2010).

Os triglicerídeos são os lipídios neutros de armazenamento de energia e carbono mais comum nas microalgas que são estocados em gotículas de óleo no citosol. Eles são formados pelo glicerol e três tipos de ácidos graxos que maioritariamente são saturados ou monoinsaturados de cadeia média, no entanto, também podem apresentar em menor proporção ácidos graxos poli-insaturados (Huerlimann et al., 2014b). Goldberg e Cohen (2011) acreditam que os triglicerói s com um alto conteúdo de PUFA, mais que uma função de armazenamento energético, cumprem uma função de depósito para uma rápida construção de membranas cloroplasmáticas (Khozin-Goldberg & Cohen, 2011).

Por outra parte, os glicolipídios e fosfolipídios são os principais constituintes da membrana celular, eles são compostos por ácidos graxos de cadeia longa maioritariamente insaturados, para conferir fluidez, permeabilidade seletiva e flexibilidade a membrana, sobretudo no processo de divisão celular (Bergé & Barnathan, 2005; Roy & Pal, 2014). A estrutura dos glicerofosfolipidíos é formada pelo glicerol esterificado a dois ácidos graxos nos carbonos 1-2 e ao ácido fosfórico no carbono 3.

O perfil de ácidos graxos e a quantidade de lipídios varia de espécie em espécie e é dependente das condições de cultivo (Sibi et al., 2015). Muitas microalgas oleaginosas podem ser induzidas a acumular lipídios com um conteúdo que vai desde 1 até 75 % lipídios/peso seco (Adarme-vega et al., 2013; Amaro, Macedo, & Malcata, 2012; Pragya, Pandey, & Sahoo, 2013).

As estratégias mais usadas para levar a um aumento na porcentagem de lipídios totais são submeter as microalgas a cultivos com estresse celular, especialmente com limitação de nutrientes. Porém, estas condições de cultivo são desfavoráveis para a produtividade de biomassa, afetando diretamente a produtividade de lipídios, parâmetro que é essencial para o uso dos lipídios em aplicações de biocombustíveis ou produção de ômega 3. Por isso, é importante encontrar um equilíbrio entre o crescimento do microrganismo e a porcentagem de lipídios acumulado na biomassa (Yilancioglu, Cokol, Pastirmaci, Erman, & Cetiner, 2014; Zhao et al., 2014).

O perfil de ácidos graxos determina a possível aplicação industrial dos lipídios. Os lipídios ricos em ácidos graxos saturados e monoinsaturados de cadeia média, especialmente C16:0 e C18:1, são mais indicados para sua aplicação em biocombustíveis, porque apresentam maior estabilidade oxidativa para o transporte do combustível, e os lipídios com alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados são mais indicados para formulação de alimentos para humanos e na aquicultura (Amaro et al., 2012; Atalah et al., 2007; Nwokoagbara et al., 2015).

3.8 SÍNTESES DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (ÔMEGA 3)

Tem-se reportado duas vias para a produção de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3. A primeira é a utilizada por organismos eucarióticos, via aeróbia, onde se realiza um processo de dessaturações que consiste na adição de duplas ligações em lugares específicos da

cadeia de ácidos graxos, feita pela ação de enzimas dessaturase usando o oxigênio e elétrons obtidos do NADPH e um processo complementar de elongações realizados na cadeia pelo acréscimo de dois carbonos por cada ciclo, ação que é catalisada por enzimas denominadas elongases. Essa via é conhecida como a convencional Δ 6 dessaturase (Khozin-Goldberg & Cohen, 2011; Li et al., 2011). A segunda via de produção de PUFA é anaeróbia, encontrada principalmente em procariotas e denominada poliquetídeo sintase (PKS) (Bergé & Barnathan, 2005; Citadin, 2007; Ward & Singh, 2005).

Em microrganismos fotossintéticos, a síntese dos ácidos graxos de cadeias de 16 C até 18 C é desenvolvida no espaço tilacóide da estrutura dos cloroplastos, mas os processos de elongação e dessaturação são feitos no reticulo endoplasmático liso, onde os ácidos graxos são transportados depois de realizada a primeira dessaturação para gerar o ácido oleico (O C18:1) (Huerlimann et al., 2014a; Liu & Lin, 2001).

3.8.1 Produção de PUFA via aeróbia

O procedimento da via convencional para a formação de PUFAs do tipo ômega 3 é iniciado pela participação da enzima Δ15 dessaturase que agrega uma dupla ligação ao ácido linoléico (AL C18:2) para gerar o ácido α linolênico (ALA C18:3), que posteriormente sofre outra dessaturação com a enzima Δ 6 dessaturase para transforma-lo no ácido estearidônico (SDA C18:4). Depois acontece uma elongação, sintetizando o ácido eicosatetraenóico (ETA C20:4) e finalmente é feita uma dessaturação com a enzima Δ 5 dessaturase para formar o ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5).

A formação do ácido docosahexaenóico (DHA C22:6) pode seguir a via linear ou a via “sprencher”; na via linear continua com a elongação de EPA para gerar o ácido docosapentaenóico (DPA C22:5) e por ultimo se agrega uma dupla ligação para produzir o DHA, esta rota tem sido observada na maioria das microalgas (Harwood & Guschina, 2009). A via sprencher, usada pelos mamíferos, apresenta uma diferença da via linear, onde a partir do EPA acontecem duas elongações consecutivas e uma dessaturação na posição Δ 6 para a formação do ácido tetracosahexanoico (THA C24:6). Esta cadeia é cortada em dois carbonos via β oxidação no peroxissomo, gerando o DHA (Bergé & Barnathan, 2005).

Uma alternativa da via convencional de síntese de ômega 3 é o uso da via Δ 8 dessaturase, na qual é primeiro realizada uma elongação com a Δ 9 elongase transformando o

ALA em ácido eicosatrienóico (ERA C20:3). Depois com a Δ 8 dessaturase se agrega uma dupla ligação, formando o ácido eicosatetranóico (ETA C20:4) o qual é dessaturado da mesma forma que no caminho convencional com a enzima Δ 5 dessaturase para formar o EPA e posteriormente o DHA. Este metabolismo alternativo é evidenciado nos protistas *Euglena gracilis, Tetrahymena pyroformis, Acanthamoeba* spp. e algumas microalgas como *Pavlova salina* e *Isochrysis galbana* (Cao et al., 2012; Li et al., 2011). Por outra parte, ácidos graxos ômega 6 que seguem a via convencional podem converter-se em ômega 3 por uma dessaturação das enzimas Δ 15, Δ 17 e Δ 19 dessaturase, como pode ser observado na figura 7 (Cao et al., 2012).

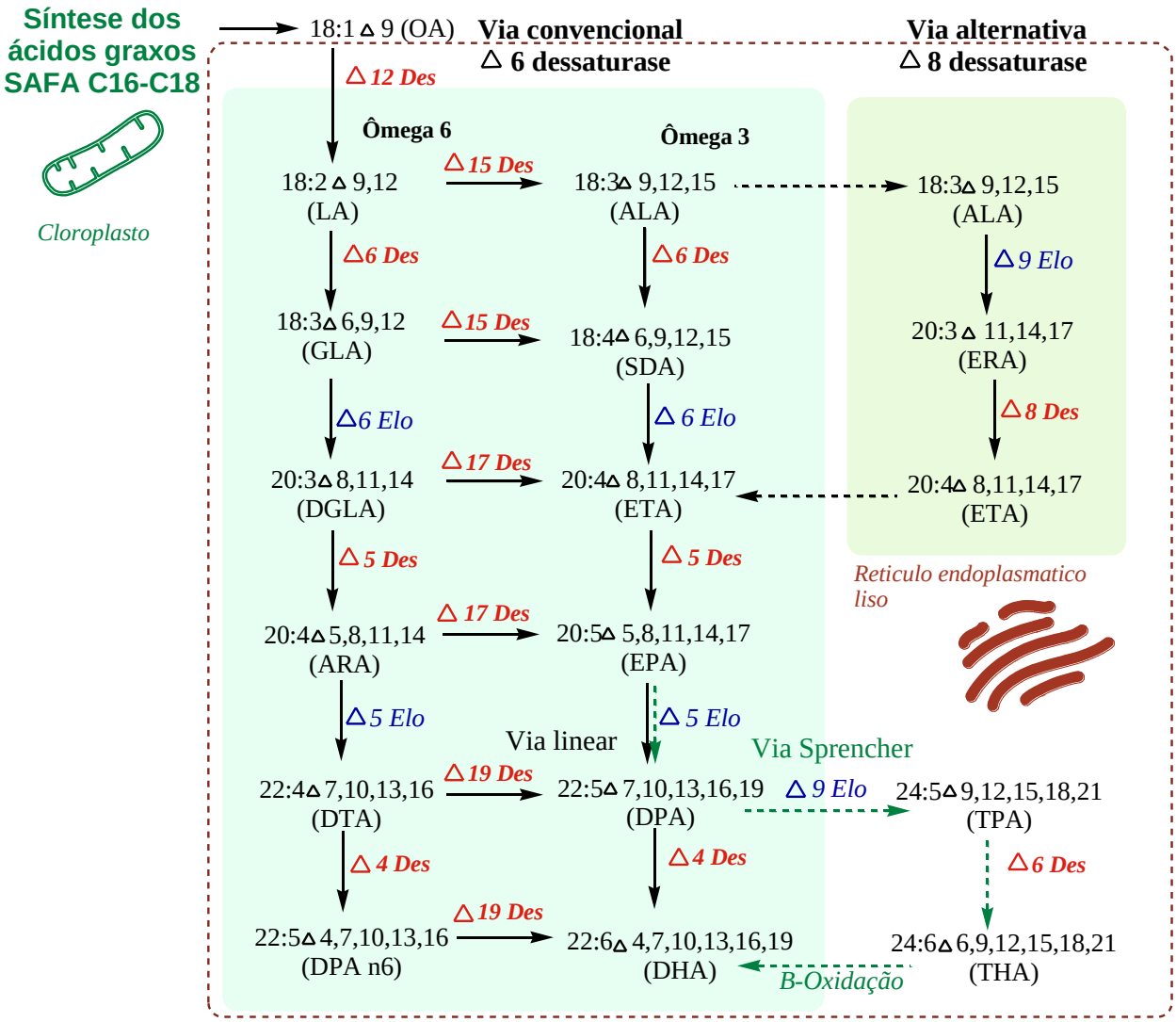


Figura 7 Diagrama esquemático das rotas aeróbias para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados DHA e EPA.

Adaptado de (Citadin, 2007; Gong et al., 2014)

As dessaturases Δ 4, Δ 5, Δ 6 e Δ 8 foram identificadas na maioria de animais e microrganismos. Por enquanto, as metil dessaturases Δ 12 e Δ 15 estão presentes em plantas e microrganismos (Cao et al., 2012). Os dois grupos de dessaturases são indispensáveis na produção de poli-insaturados ômega 3 de cadeia longa e é por isso que os animais e as plantas não conseguem sintetizá-los de uma forma completa e seus precursores devem ser suplementados para conseguir realizar sua produção (Gong 2014).

3.8.2 Produção de PUFA via anaeróbia

A síntese de PUFA através da via anaeróbia poliquetídeo sintase (PKS) foi descoberta na bactéria marinha *Shewanella pneumatophori* SCRC-2378 e posteriormente identificada em outros microrganismos como *Photobacterium profundum, Moritella marina, Colwellia psychrerythraea* e a microalga *Schizochytrium*. Ao contrario do sistema convencional que precisa de oxigênio para realizar as desaturações na cadeia metil carbonada, a dupla ligação é introduzida de forma anaeróbia por uma enzima bifuncional denominada DH/IS (β-hidroxiacil- ACP dehydratase/isomerase) durante uma iterativa extensão da cadeia de ácidos graxos, utilizando acetil CoA como primeira molécula para a sínteses de EPA ou DHA (Cao et al., 2012; Khozin-Goldberg & Cohen, 2011).

3.9 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE ÔMEGA 3 EM MICROALGAS

No cultivo de microalgas as características de crescimento e da composição celular são fortemente influenciadas pela interação entre os múltiplos fatores nutricionais e físicos.

A biossíntese das PUFAs da família ômega 3 pode ser estimulada por estresse a baixas temperaturas, variação na salinidade, intensidade de luz, concentração de CO_2 e aeração, fase de cultivo, exposição a radiação UV e eletroestimulações (Adarme-vega et al., 2012; Atalah et al., 2007; Carvalho & Malcata, 2005; Eismann, 2014). Condições de estresse nestes parâmetros provocam mudanças nas propriedades físicas e de fluidez nas membranas celulares, gerando uma série de respostas bioquímicas que incluem a ativação e desativação de genes para conseguir a aclimatação do microrganismo às novas condições de cultivo (Los & Murata, 2004; I Tzovenis, Pauw, & Sorgeloos, 1997; Yoshioka et al., 2012).

Existem três formas de produzir altas concentrações de PUFAs do tipo ômega 3 com microalgas nativas que têm sido referenciadas como produtoras destes ácidos graxos (Grima et al., 1992):

1. Incrementando a produtividade da biomassa;
2. Maximizando seu potencial fisiológico com a manipulação de condições de cultivo para direcionar um aumento na produção de lipídios;
3. Otimizando condições de cultivo para gerar um incremento na porcentagem das PUFAs de interesse.

3.9.1 Efeito da temperatura e estresse osmótico na membrana

O mecanismo de adaptação a temperaturas baixas em microalgas é atribuído à alteração das composições de ácidos graxos, aumentando a proporção dos poli-insaturados com respeito aos saturados (Sibi et al., 2015). Como foi dito anteriormente, a membrana celular esta composta principalmente por fosfolipídios e glicolipídios, que em condições normais proporcionam uma boa fluidez na membrana. Mas, quando as condições de cultivo não são as ideais e as células estão em um ambiente com elevadas temperaturas, pode existir degradação de compostos celulares que causam fluidização da membrana, provocando uma entrada e saída de nutrientes e elementos sem regulação, induzindo a morte celular.

Pelo contrario, ambientes em baixas temperaturas provocam uma rigidez na membrana celular que não permite um intercambio de substâncias essenciais ao interior das células, o que também traz como consequência a apoptose celular. Como resultado da diminuição de fluidez da membrana e para manter a função da mesma em baixas temperaturas, as microalgas ativam as enzimas dessaturases e geram ácidos graxos poli-insaturados como resposta, já que estes tem um ponto de fusão a temperaturas menores que os ácidos graxos saturados, garantindo boas propriedades de fluxo nestas condições (Jiang & Gao, 2004). Este efeito tem sido demostrado e esclarecido em diversas pesquisas moleculares de cultivo de algas e microalgas (An et al., 2013; Gladyshev et al., 2011; Harwood & Guschina, 2009; Jiang & Gao, 2004).

Conforme a revisão feita por Los e Murata (2004), acredita-se que um estresse hiperosmótico pode reduzir a fluidez da membrana similar ao estresse a baixas temperaturas e que um estresse hiposmótico gera fluidização da membrana da mesma forma como sucede a altas temperaturas (figura 8). A consequência da variabilidade na salinidade é bem

identificada no mecanismo de osmorregulação nos microrganismos pela acumulação de solutos compatíveis, como o glicerol, para balancear os níveis intracelulares de concentração. Mas pouco se sabe da sua ação na acumulação de lipídios totais e alteração dos ácidos graxos na membrana celular.

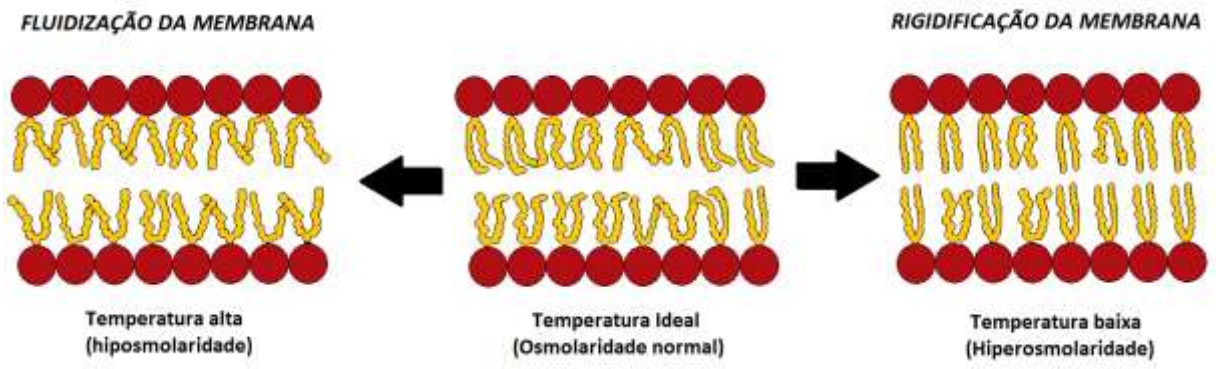


Figura 8 Mudançãs na estrutura e fluidez da membrana sob condições de estresse a baixas e altas temperaturas.

Adaptado de: (Los & Murata, 2004)

Azachi *et al* (2002) reportaram que a coenzima β cetocil sintase (Kcs) encarregada da síntese de condensação de malonil CoA e acil CoA (primeiro passo limitante da elongação de ácidos graxos), foi maior nas células que foram transferidas de uma salinidade de 0.5 M a uma salinidade de 3.5 M NaCl na microalga *Dunaliella salina.* Os autores afirmam que a adaptação celular a choques salinos implicam modificações na composição de ácidos graxos nos microssomas e membranas da microalga.

Al-hasam *et al* (1987) encontraram que o aumento de concentração de NaCl no meio de cultivo de *Dunaliella salina,* afetou o perfil lipídico de ácidos graxos e as respostas bioquímicas da microalga. Por um lado aumentou a produção de carotenoides, clorofila e a porcentagem do ácido α linolênico (C18:3 ω3) no perfil lipídico, mas por outro diminuiu o crescimento e a porcentagem de lipídios totais.

De maneira oposta, Theresia *et al*. (2012) encontrou que para a dulcícola *Chlorococcum* sp. um aumento na salinidade de 0 - 2 % de NaCl, provocou uma diminuição na concentração da biomassa mas teve um acréscimo no porcentagem de lipídios. Se bem que a maior produtividade de lipídios foi alcançada com uma concentração de sal de 1 % (Theresia et al., 2012).

3.9.2 Intensidade de luz

A variação na intensidade de luz é reportada na literatura como um parâmetro ambiental importante que, além de influenciar a fotossíntese, contribui na modificação da composição e acumulação dos lipídios (Pal, Khozin-Goldberg, Cohen, & Boussiba, 2011). Em processos a grande escala, a intensidade media de luz natural à qual o cultivo é submetido é de 2000 μmol fotons/m^2s, nesta intensidade luminosa, pode ser produzido danos no sistema fotossintético das microalgas comprometendo o ótimo crescimento da microalga (Chisti, 2007).

As máximas taxas de crescimento são alcançadas em uma faixa de saturação luminosa, onde as microalgas podem aproveitar eficientemente a energia da luz para transforma-la em energia química. Pelo geral, este intervalo de saturação luminosa nas microalgas é logrado aos 100 ou 200 μmol fotons/m^2s que representam dentre 5 % até 10 % da intensidade de luz solar. As melhores condições de intensidade luminosa para a produção de poli-insaturados são específicas para cada microalga (Chisti, 2007; Guihéneuf et al., 2009).

Em algumas microalgas, altos níveis de irradiação são conhecidos por gerarem o aumento nos ácidos graxos saturados, mas também por elevarem a acumulação de DHA. Pelo contrário, baixos níveis de irradiação permitem a acumulação de PUFAs, entre eles o EPA. Conforme Carvalho e Macalta (2005) o acréscimo de ácidos graxos poli-insaturados frente a um estresse luminoso baixo é devido á necessidade de sintetizar uma maior quantidade de lipídios complexos, como os galactolipídios que são constituintes das membranas tilacóides.

Sob condições de saturação luminosa, Tzovenis *et al.* (2003) observaram que, enquanto o C18:3 ω3 permaneceu constante, a produção de ácidos graxos C 18:3 ω6 e 18:5 ω5 foi reduzida, e o DHA C22:6 ω3 e o EPA C20:5 ω3 aumentaram, indicando uma provável mobilização desses ácidos graxos para as membranas tilacóides, que possivelmente é seguida da dessaturação e elongação de cadeia.

3.9.3 Aeração

A aeração num cultivo fotoautotrófico é um parâmetro importante que tem duas funções principais: a primeira é a introdução da fonte de carbono inorgânica que é um nutriente indispensável para o crescimento do microrganismo, os processos energéticos e de dessaturação das cadeias de ácidos graxos, e a segunda é permitir a eliminação do oxigênio gerado pelas microalgas para evitar sua saturação.

Uma variação na vazão de ar pode alterar a relação O_2/CO_2 no meio, gerando aumento de espécies reativas ao oxigênio, como O_2^- e H_2O_2. Estas espécies apresentam elevada toxicidade e provocam danos nas membranas celulares, pelo qual, em alguns casos, as microalgas elevam sua produção de PUFAs para usá-las como antioxidantes e evitar o dano celular (Adarme-vega et al., 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

A microalga *Isochrysis galbana* foi escolhida para realizar este estudo por suas boas características bioquímicas e sua capacidade de gerar uma porcentagem considerável de ácidos graxos poli-insaturados. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo laboratório de fotossínteses do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A visualização microscópica da morfologia da microalga é apresentada na figura 9.

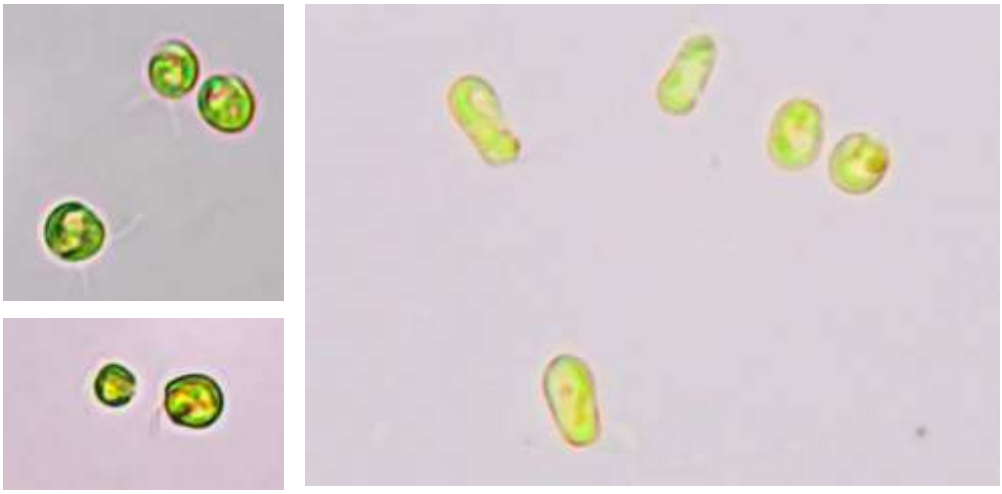


Figura 9 Visualização da morfologia microscópica a 1000 X de *Isochrysis galbana* após 4 d de cultivo sob diferentes condições de cultivo.

4.2 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo empregado foi o meio sintético F/2 guillard (tabela 5), reportado amplamente na literatura para seu uso com microalgas marinhas (Guillard, 1975). Neste trabalho, a solução de silicato do meio original não foi adicionada, devido a que *Isochrysis galbana* não apresenta parede celular e esse nutriente é imprescindível só para a síntese dessa estrutura.

A água marinha artificial foi preparada a diferentes concentrações com sal marinho comercial “Redfish” dissolvida em água deionizada e filtrada com membranas de mistura de éster de celulose com tamanho de poro de 0.45 μm. A composição de nutrientes presentes no sal marinho comercial não foi levada em consideração.

Tabela 5 Concentração final dos componentes do meio F/2 Guillard, sem silicato, em água marinha sintética.

FONTE	COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
Nitrato	$NaNO_3$	75
Fosfato	$NaH_2PO_4.H_2O$	5
Metais traços	$FeCl_3.6H_2O$	3.15
	Na_2EDTA	4.36
	$CuSO_4.5H_2O$	$9.8*10^3$
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	$6.3*10^3$
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.022
	$CoCl_2.6H_2O$	0.01
	$MnCl_2.4H_2O$	0.18
Vitaminas	Cianacobalamina (B12)	0.1
	Tiamina	$5*10^4$
	Biotina	$5*10^4$

As soluções de nitrato, fosfato, metais traços e a água marinha sintética foram autoclavadas separadamente a 1 atm e temperatura de 121 °C por 20 min. Depois de esterilizada, a água marinha artificial foi deixada 24 h em repouso a temperatura ambiente, para a estabilização dos gases antes da preparação do meio. A solução de vitaminas foi esterilizada por filtração com membrana de seringa de 0.20 µm, em câmara de fluxo laminar.

O pH inicial do meio foi ajustado num intervalo de 7.8 – 8.2 simulando o pH da agua de mar natural que é ligeiramente alcalina.

Pré-inoculo

O pré-inoculo de *I. galbana* foi preparado no meio F/2 Guillard sem silicato com uma salinidade de 30 g/L em um Erlenmeyer de 1L com um volume efetivo de trabalho de 600 mL, sob intensidade de luz de 170 µmol fotons/m^2s, fotoperíodo de luz escuridão (L:E) 12:12 h e aeração de 1 vvm. A temperatura da sala de cultivo foi mantida constante a 23 °C usando um ar condicionado marca Springer maxifler.

As células foram transferidas ao meio de cultivo depois de 4 - 5 dias de pré-cultivo, momento no qual, o crescimento da microalga estava na fase exponencial.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Primeira etapa: Identificação de uma região de curvatura no gráfico.

Como experimento inicial, desenvolveu-se um desenho experimental de dois níveis e três fatores (2^3) com três pontos centrais, com a finalidade de identificar uma região com curvatura máxima para encontrar a condição ótima de produção de DHA, poli-insaturados do tipo ômega 3, lipídios e crescimento. O cultivo foi feito sob diferentes concentrações de salinidade (28 - 38 g/L), aeração (0.5 - 2.5 vvm) e intensidade de luz (115 - 315 µmol fotons/m^2s) (figura 10).

O fotoperíodo utilizado foi o de L:E de 12:12 h. Finalmente, no ponto central foram avaliadas duas etapas do cultivo, a etapa final de crescimento no dia 6 e a estacionária no dia 10. No dia 6 foram retirados 500 mL de meio para as posteriores análises.

Neste planejamento, desenvolveu-se 11 experimentos com três réplicas no ponto central como se descreve na tabela 6.

Tabela 6 Desenho experimental 2^3 com pontos centrais (PC).

Condição	Intensidade de luz (µmol fotons/m^2s)	Aeração (vvm)	Salinidade (g/L)
1	315	0.5	38
2	115	2.5	38
3	315	0.5	28
4	115	0.5	28
5 (PC)	215	1.5	33
6	115	2.5	28
7	315	2.5	28
8	115	0.5	38
9	315	2.5	38
10 (PC)	215	1.5	33
11 (PC)	215	1.5	33

Figura 10 Desenvolvimento do cultivo 2^3 com pontos centrais (PC).

4.3.2 Segunda etapa: Desenho fatorial com triplicata

Dos resultados e análises do experimento anterior, planejou-se um novo experimento, no qual se fixou a aeração em 2.5 vvm e foi feito um desenho experimental de três níveis e dois fatores (3^2) com variação da salinidade em 40, 47 e 55 g/L e intensidade de luz menores de 38, 67 e 130 µmol fotons/m^2s (< 5 % da intensidade de luz solar). Na tabela 7 se apresentam as nove condições experimentais avaliadas por triplicata, resultando em 27 experimentos totais.

Para esta etapa, utilizou-se uma concentração de 33 g/L de sal marinho comercial e o restante foi incrementado pela adição de NaCl. O tempo de cultivo foi de 6 dias.

Tabela 7 Desenho experimental 32 utilizando como fatores independentes a salinidade e a intensidade de luz.

Salinidade (g/L)	Intensidade de luz (µmol fotons/m^2s)
40	130
40	67
40	38
47	130
47	67
47	38
55	130
55	67
55	38

Todos os experimentos foram feitos em escala de laboratório num Erlenmeyer de 2 L com volume de trabalho de 1.6 L e a concentração de células inicial do cultivo foi fixada em $1 * 10^{6}$ cel/mL.

Aeração: O ar comprimido colocado no sistema foi filtrado com filtros de seringa de 0.20 μm para evitar a contaminação e injetado nas culturas por meio de tubos ocos de vidro. Uma rolha de gaze e algodão hidrofóbico foi usada para fechar os Erlenmeyers, garantindo a inocuidade do cultivo e o intercâmbio efetivo dos gases com a atmosfera. As diferentes vazões de ar avaliadas foram controladas utilizando um rotâmetro de gás (RWR, 0 - 15 L/min).

Salinidade: Visando evitar mudanças na salinidade pela evaporação de agua, diariamente foram avolumados os meios de cultivo com água deionizada esterilizada. Posteriormente foram tiradas alíquotas de 1 mL para medir a salinidade de cada condição com ajuda de um refratômetro manual que possui uma escala de 0 – 100 ppt (0 a 100 g/L) para que a concentração de sal desejada seja mantida.

Intensidade luminosa: A intensidade de luz foi medida no inicio dos experimentos utilizando um medidor de radiação PAR (Photosynthetically Active Radiation) de escala laboratorial QSL – 2100. As diferentes intensidades luminosas avaliadas foram fixadas segundo a distância de separação entre a superfície de cada Erlenmeyer e a fonte de luz artificial (Figura 11). No trabalho, a fonte utilizada foi de lâmpadas fluorescentes frias conectadas a um temporizador analógico sincronizado para um fotoperíodo de Luz : Escuridão de 12:12 h.

Figura 11 Desenvolvimento do cultivo do desenho experimental 3^2

4.4 ANÁLISES E PROCESAMIENTO DA BIOMASSA

4.4.1 Obtenção da biomassa liofilizada

A biomassa seca necessária para as análises bioquímicas foi coletada na etapa de crescimento e estacionária do cultivo. Primeiro, a biomassa foi concentrada e separada do meio por centrifugação, utilizando-se a centrifuga Excelsa II (Mod 206 BL) a 3500 rpm por 10 min. O processo de centrifugação foi repetido mais uma vez adicionando água deionizada para eliminar o sal residual presente na biomassa.

Em seguida, a biomassa úmida foi congelada a temperatura negativa de – 15 ° C em tubos de plástico e finalmente transferida ao liofilizador para executar a secagem da biomassa por sublimação.

4.4.2 Avaliação de crescimento

O crescimento celular das microalgas foi monitorado por contagem de células (cel/mL) utilizando um microscópio óptico Olympus e uma câmara de contagem Fuchs Rosenthal. Diariamente foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada condição de cultivo, nas quais foram adicionados 10 µL de lugol acético para fixar as células móveis e prosseguir com a contagem.

A taxa específica de crescimento (µ) foi determinada no crescimento exponencial da microalga. Matematicamente µ é expressada segundo a equação linear 1.

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \qquad \int_{X_0}^{X_f} \frac{dx}{X} = \int_{t_0}^{t_f} \mu \, dt \quad com \;\; t_0 = 0 \qquad lnX_f = \mu \, t_f + \ln X_0 \qquad (1)$$

No qual µ está em d^{-1} e X, que é a densidade celular, em cel/mL. A determinação deste parâmetro foi feita mediante um ajuste linear em um gráfico logarítmico da densidade celular vs o tempo de cultivo, onde µ é o coeficiente angular da equação.

A produtividade de biomassa (P_x) foi determinada pela equação 2, na qual a biomassa (X) esta em g/L e o tempo (t) em dias.

$$P_X = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \qquad (2)$$

4.4.3 Determinação da concentração em peso seco livre de cinzas

A determinação de peso seco foi feita por gravimetria e desconto de cinzas após calcinação. Ao final do cultivo e depois de avolumar e homogeneizar os meios, 15 mL de amostra foram filtradas a vácuo, utilizando-se membranas de vidro com tamanho de poro de 0.7 μm previamente pesadas e tratadas em forno de mufla a 575 °C por 1 h.

Um volume de solução de lavagem NH_4HCO_3 (0.5 M) equivalente ao volume da amostra filtrada foi usada para remover o excesso de sal no filtro. Em seguida, a membrana foi retirada do sistema de filtração a vácuo e transferida para secar em estufa a 60 °C por 1h para sua posterior pesagem. O peso seco da membrana com cinzas foi calculado utilizando a equação 3.

Com relação ao desconto de cinza, as membranas contendo as amostra foram tratadas novamente em forno de mufla a 575 °C por 1 h para sua calcinação. Após este processo, as membranas foram transferidas a um dessecador para esfriar e finalmente pesar. O peso das cinzas foram calculados utilizando-se a equação 4.

$$P_{BC} = P_{MBC} - P_M \qquad (3)$$

$$P_C = P_{MC} - P_M \qquad (4)$$

No qual P_M é o peso da membrana, P_{MBC} representa o peso da membrana com biomassa e cinza, P_{BC} é o peso de biomassa com cinza, P_{MC} peso da membrana com cinza e P_C peso de cinza.

A concentração de biomassa ausenta de cinza $[P_B]$ é obtida da subtração de P_{BC} e P_C, dividindo pelo volume de amostra filtrado (V_f) como se apresenta na equação 5.

$$[P_B] = \frac{(P_{BC} - P_c)}{V_f} \qquad (5)$$

4.4.4 Pigmentos: Clorofila A, C e carotenoides.

Os pigmentos fotossintetizantes presentes nas microalgas são compostos por clorofilas, carotenoides e ficobilinas, sendo que, cada um destes pigmentos tem uma absorbância de luz em diferentes comprimentos de ondas, fazendo possível sua quantificação por espectrofotometria (Bianchini et al., 2006).

Para conduzir a extração dos pigmentos fotossintéticos, foram filtrados 10 mL da amostra a vácuo com membranas de vidro de tamanho de poro de 0.7 μm. Em seguida, os filtros foram colocados no interior de tubos Falcon cobertos com fita preta (para proteger os pigmentos da degradação pela incidência da luz branca) e foi adicionado 7 mL de acetona a 90 %. Logo após, procedeu-se a maceração das membranas com auxílio de um bastão de vidro. As amostras foram armazenadas a 4 °C por 24 h a fim de completar a extração dos pigmentos (Lourenço, 2006).

Após o período de repouso, os Falcon foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min para eliminar materiais em suspensão e finalmente a leitura espectrofotométrica foi feita utilizando uma cubeta de vidro de quartzo e um espectrofotômetro de comprimento de onda visível, marca Bel potonies (1105).

Quando a leitura no comprimento de onda em 750 nm foi superior do que 0.02, a amostra teve que ser centrifugada novamente para eliminar os resíduos em suspensão.

A quantificação de clorofilas A e C foi feita segundo as equações 6 e 7 propostas por Jeffrey e Humphrey (Jeffrey & Humphrey, 1975; Ritchie, 2008).

$$Clorofila\ A\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right) = [11.85 * A_{664\,nm} - 1.54 * A_{647\,nm} - 0.08 * A_{630\,nm}] * \frac{v}{V * C} \quad (6)$$

$$Clorofila\ C\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right) = [24.52 * A_{630\,nm} - 1.67 * A_{664\,nm} - 7.60 * A_{647\,nm}] * \frac{v}{V * C} \quad (7)$$

Em que: v= Volume de acetona usado para a extração dos pigmentos (L) , V= volume filtrado da cultura (L), c= caminho óptico da cubeta (cm).

Aproveitando o mesmo extrato em acetona obtido no processo para a quantificação de clorofila A e C, estimou-se por espectrofotometria a concentração total de carotenóides usando a equação 8, proposta por Strickland e Parsons (Lourenço, 2006; Strickland & Parsons, 1968).

$$Carotenóides\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right) = [7.6 * A_{480\,nm} - (3.0 * A_{750\,nm}) - 1.49 * A_{510\,nm} - (2.0 * A_{750\,nm})] * \frac{v}{V * C} \quad (8)$$

4.4.5 Carboidratos totais

O método colorimétrico fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al*. (1956) foi empregado para a determinação de carboidratos totais solúveis em água na biomassa seca de *Isochrysis galbana* (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). Esse método é baseado na reação exotérmica dos diferentes tipos de açúcares com o fenol e o ácido sulfúrico gerando uma coloração laranja estável, que pode ser quantificada por espectrofotometria.

O procedimento de Myklestad e Haug (1972) foi usado para o tratamento da biomassa e liberação dos carboidratos. Para isso, pesaram-se entre 10 – 20 mg de biomassa seca num tubo de ensaio de vidro comprido e foi adicionado 2 mL de H_2SO_4 a 80 % imerso em um banho de gelo. Em seguida as amostras foram deixadas sob refrigeração por um período de 16 – 20 h, durante o qual, é concluída a liberação dos açúcares (Myklestad & Haug, 1972).

Após esta fase de extração, foram adicionados 6 mL de água deionizada e o extrato foi filtrado em membranas de fibra de vidro previamente tratadas em forno de mufla por 1 h e 575 °C para eliminar qualquer impureza orgânica. Do filtrado, foram pipetados 100 µL no interior de um tubo de ensaio de vidro comprido e diluído até 1 mL com água deionizada. Em seguida 0.5 mL de fenol a 5 % foram adicionados na mistura e, para finalizar a reação, adicionou-se 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado.

O fenol e o ácido sulfúrico foram acrescentados diretamente na amostra e não pelas paredes do tubo de ensaio, garantindo que a reação seja feita completamente. Agitou-se vigorosamente a mistura com ajuda de um vortex e após 30 min de repouso para esfriar as amostras, foi feita a leitura espectrofotométrica da absorbância em um comprimento de onda a 485 nm.

A concentração de carboidratos totais é medida com base em uma curva de calibração de D-glicose anidrida num intervalo de 0 - 60 mg/L, cuja equação linear é apresentada na equação 9 com um R^2= 0.9975. No anexo 1 é descrito o procedimento desenvolvido para realizar a curva de calibração utilizada.

Neste trabalho, os carboidratos são apresentados em porcentagem (m/m) relacionando o peso de carboidratos obtidos com o peso inicial da amostra utilizada.

$$Y = 0.0121 * X \qquad X = \frac{Y}{0.0121} \qquad (9)$$

Y representa a absorbância e X a concentração de carboidratos totais (mg/L)

4.4.6 Lipídios Totais

A extração de lipídios totais foi desenvolvida com base no método em frio de Bligh e Dyer (1959), utilizando uma mistura de solventes clorofórmio:metanol (Bligh & Dyer, 1959). A quantificação de lipídios foi realizada por gravimetria.

Em primeiro lugar, utilizou-se um pré-tratamento ácido para garantir a efetividade da extração. Para isso, pesou-se entre 80 – 100 mg de biomassa seca num tubo Falcon, adicionou-se 3 mL de HCL diluído (2 M) e a mistura foi mantida por 2 h submersa em um banho termostatizado a 40 °C. Após este tempo, a mistura foi centrifugada na centrífuga Excelsa II a 3000 rpm durante 10 min. Retirou-se o resíduo de ácido com ajuda de uma seringa de vidro com agulha longa. Este pré-tratamento de digestão ácida foi fraco, já que a microalga utilizada não possui parede celular e só tem uma cobertura de membranas. Para o tratamento ácido ser efetivo em outras espécies de microalgas, deve-se aumentar a quantidade do ácido e se colocar o banho termostatizado a 80 °C por 1 h.

No Falcon com a biomassa pré-tratada, foram adicionados 4 mL de metanol, os quais foram homogeneizados com auxilio de um vortex; adicionou-se 2 mL de clorofórmio que também foram agitados durante 2 min. Finalmente, agregou-se mais 2 mL de clorofórmio e 3.6 mL de água deionizada que foram misturados com vortex cada um por 2 min.

A solução obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e, do sistema trifásico formado com ajuda de uma seringa de vidro de agulha longa, foi retirada a fase inferior que contem os lipídios dissolvidos no clorofórmio, os quais foram transpassados a um balão de vidro com boca esmerilhada previamente pesado.

O processo de re-extração dos lipídios que ainda ficaram na biomassa, foi feito duas vezes com a adição de 4 mL de uma solução de 10 % de metanol em clorofórmio, seguindo a metodologia de centrifugação e recuperação de lipídios descrita anteriormente. As soluções de metanol, clorofórmio e de 10 % de metanol em clorofórmio continham 11 ppm de antioxidante Kerobit TP 26 para proteger os lipídios da oxidação de ácidos graxos.

O excesso de clorofórmio foi evaporado em um evaporador rotatório a vácuo a 50 °C e, depois, o balão foi secado em estufa durante 24 h a 40 °C para finalmente ser pesado em

balança analítica. O balão com o extrato lipídico foi armazenado em um dessecador a vácuo até seu posterior uso.

4.4.7 Análises do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa

O perfil de ácidos graxos em porcentagem foi definido por cromatografia gasosa. A partir do extrato lipídico seco, se fez a esterificação metanólica dos ácidos graxos (FAMEs) conforme o procedimento de Jham e Campos (1982), cuja finalidade é aumentar a volatilidade da molécula que contem o ácido graxo, favorecendo a separação dos compostos na coluna de cromatografia e facilitando sua identificação (Jham & Campos, 1982).

No balão com os lipídios, foi adicionado 1 mL da solução KOH:metanol (0.5 M) e, seguidamente, foi levado a banho maria a 100 °C durante 5 min para a hidrólise dos lipídios gerando sais de ácido graxo. Posteriormente, se adicionou 1 mL da solução de HCl : Metanol (1:4) por mais 15 min em banho a 100 °C para desenvolver a esterificação ácida dos ácidos graxos.

Continuamente, os balões foram esfriados com 3 mL de água deionizada e a recuperação dos metil-ácidos graxos foi feita por duas lavagem de 3 mL de éter de petróleo. A fase aquosa foi descartada e a fase superior onde ficaram os metil-ésteres de ácidos graxos diluídos em éter de petróleo foram transferidos a frascos tipo penicilina e armazenado a temperatura negativa de – 20 °C até as análises.

No momento da determinação de FAMEs por cromatografia gasosa, o éter de petróleo foi evaporado e as amostras foram resuspensas em 1.5 mL de tolueno para sua posterior injeção. O cromatógrafo a gás usado é de marca Shimadzu, modelo GC-2010, com detector de ionização em chama. Foi empregada uma coluna polar DB23 (Agilent) com dimensões de comprimento, diâmetro interno e espessura do filme de 30 m, 0.25mm e 0.25μm respetivamente.

A programação da temperatura foi feita em rampa com a finalidade de obter uma boa separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Ao inicio, se aumentou a temperatura 50°C por minuto; no intervalo de 50 °C a 150 °C o gradiente de temperatura foi 25 °C por minuto e isoterma de 1 minuto; de 150 °C a 200 °C o aumento foi feito com uma gradiente de 4 °C por min e isoterma por 3 min e finalmente se incrementou a temperatura de 200 °C a 240 °C com um gradiente de 5 °C por min e isoterma por 5 min. A temperatura do detector foi fixada em

280 °C. O hélio a 99.95 % foi usado como gás de arraste e o N_2, H_2 e ar sintético foram empregados como gases auxiliares.

A identificação dos FAMEs foi feita por comparação do tempo de retenção com a mistura de 37 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia C4:0 até C24:0 da sigma. Os cromatogramas e porcentagem de área dos picos de cada amostra foram obtidos pelo software GC solution (Shimadzu)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados da fase experimental foi realizada com ajuda do software Statistica versão 7.0. Com esse mesmo programa, foram construídos os gráficos de Pareto, medias marginais, superfícies de resposta e o uso da função *Desirability* para a otimização das condições de cultivo.

Para as análises de variância ANOVA, foi aceito um nível de confiança de 95 % em todos os testes (α=0.05). Os resultados estatísticos são apresentados no Anexo 2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRA ETAPA

De acordo com a metodologia do item 4.3.1, nesta primeira etapa de procura de curvatura máxima para os ácidos graxos poli-insaturados e DHA no cultivo fotoautotrófico de *Isochrysis galbana* foram avaliados três parâmetros e dois níveis com pontos centrais: salinidade (28 - 38 g/L), intensidade luminosa (115 - 315 µmol fotons/m^{2}s) e aeração (0.5 vvm – 2.5 vvm).

5.1.1 Cinética de crescimento e biomassa seca

A curva de crescimento celular de *Isochrysis galbana* foi similar para todas as condições de cultivo testadas, como se pode verificar na figura 12. Na maioria dos testes a microalga não apresentou uma fase de adaptação celular, o que é desejado industrialmente para ter uma boa produtividade. Porém, alguns cultivos com salinidade de 38 g/L tiveram baixa duplicação celular nas primeiras 24 h, para depois entrar na fase de crescimento exponencial até o dia 5 – 6, e finalmente quando algum nutriente essencial fosse esgotado, começar a etapa estacionária.

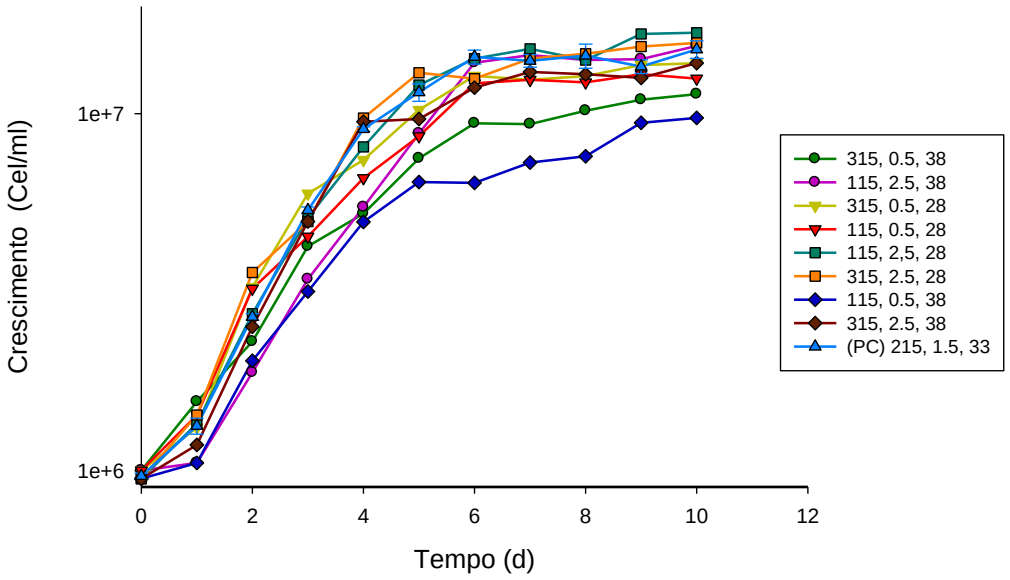


Figura 12 Cinética de crescimento de *Isochrysis galbana* sob diferentes condições de intensidade de luminosa, aeração e salinidade

Segundo a análise estatística, o crescimento final em termos de cel/mL e de concentração celular em base seca, estiveram próximas de ser significativas. Conforme os diagramas de significância na figura 14, a vazão de ar mostrou ser a variável que teve maior impacto na densidade celular (valor p=0.052) afetando positivamente o crescimento. De forma oposta, um aumento na salinidade gerou uma pequena diminuição no total de biomassa, pelo qual, os tratamentos com a maior salinidade e menor vazão de ar, independente da intensidade luminosa avaliada, exibiram um menor crescimento celular como pode ser observado nas figuras 12 e 13. Lin *et al.* (2007) também concluiu que um aumento na vazão de ar comprimido é benéfico para o crescimento da microalga.

O leve aumento da biomassa e da densidade celular com respeito ao aumento da vazão de ar pode ser explicado por uma maior disponibilidade de CO_2 no meio. A máxima densidade celular e concentração final de biomassa obtida neste trabalho a partir de uma concentração inicial de $1*10^6$ cel/mL foi de $1.69 * 10^7$ cel/mL e 326.7 mg/L respetivamente, cultivada a 115 μmol fotons/m^2s, 28 g/l de sal e 2.5 vvm de ar. Em condições similares de cultivo de *Isochrysis galbana*, usando água marinha sintética enriquecida com F/2 e aeração com ar comprimido, Liu *et al*. (2001) obtiveram uma máxima concentração de biomassa de 230 mg/L, coletada em 8 dias de cultivo (Liu & Lin, 2001).

No entanto, comparando este trabalho com pesquisas onde é utilizado ar comprimido enriquecido com CO_2, a concentração da biomassa alcançada foi inferior, o que permite identificar uma limitação de crescimento por insuficiência da fonte de carbono (0.03 % no ar). Há reportes de que as microalgas podem tolerar até 10 % de CO_2 na aeração (Theresia et al., 2012).

Picardo *et al.* (2013) fizeram a comparação de um cultivo descontínuo de *Isochrysis galbana* com aeração convencional e ar enriquecido com 5 % de CO_2 e alcançaram um aumento na biomassa de 250 mg/L a 420 mg/L respetivamente (Picardo et al., 2013). Sen *et al*. (2005) conseguiram uma concentração celular muito alta de $1.2 * 10^9$ cel/mL de *Isochrysis galbana* em condições de cultivo de 30 g/L de salinidade, iluminação continua e ar enriquecido com CO_2 (Sen & Koçer, 2005).

A influencia da intensidade de luz no crescimento de *Isochrysis galbana* foi avaliada por Marcheti *et al* (2012) e Molina *et al* (1992), os autores encontraram que para irradiações maiores do que 150 μmol fotons/m^2s, a taxa de crescimento da microalga permanece

constante, o que significa que nestas condições se alcança a saturação luminosa para o crescimento (Marchetti et al., 2012).

Estes resultados concordam com o obtido nesta pesquisa, já que para o crescimento celular e concentração de biomassa nos cultivos avaliados, a menor contribuição para sua variação foi feita pela intensidade luminosa (Anexo 2) estudada num intervalo de 115 - 315 µmol fotons/m^2s. As taxas de crescimento calculadas foram próximas entre as condições estudadas, sendo de $\mu = 0.4\ d^{-1}$ e $0.5\ d^{-1}$ apresentando um tempo de duplicação celular de 1.4 - 1.8 dias, em outras palavras, a microalga demandou de 33 até 43 h para dobrar sua densidade celular.

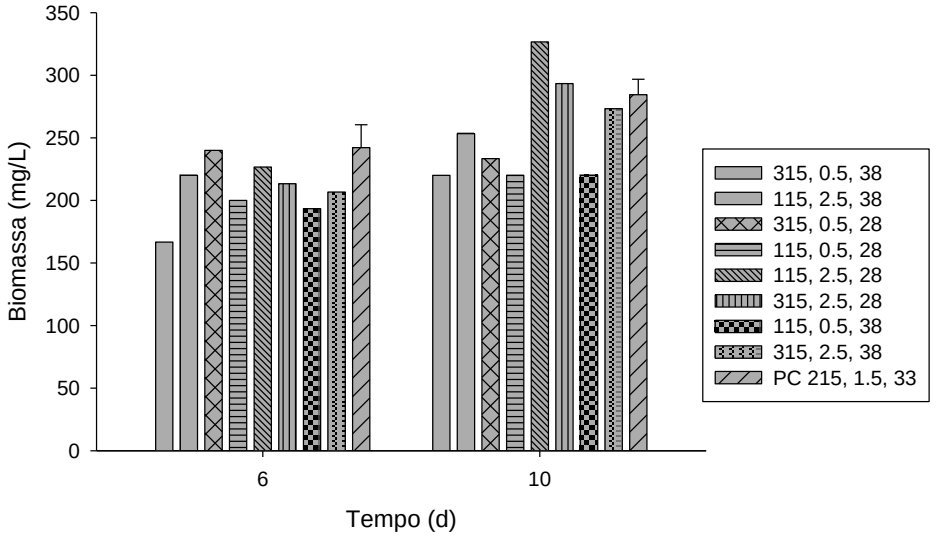


Figura 13 Concentração de biomassa obtida no dia 6 e 10 de diferentes cultivos foto autotróficos de *Isochrysis galbana*

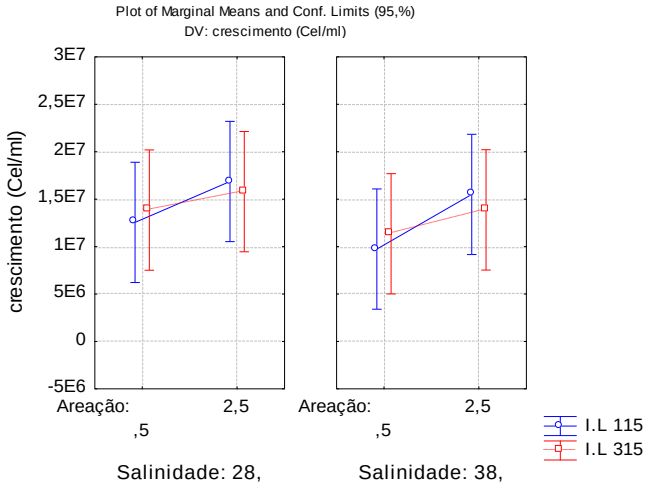


Figura 14 Diagrama de médias marginais característico para o crescimento e concentração de biomassa sob as diferentes condições de cultivo

5.1.2 Efeito da etapa de cultivo

Seguindo o desenho experimental planejado e devido a que só foram feitas três replicas para o ponto central, a avaliação do efeito da idade do cultivo se fez com base nesta condição central de salinidade de 33 g/L, aeração de 1.5 vvm e intensidade luminosa de 215 μmol fotons/m^2s. Os resultados obtidos foram resumidos na tabela 8.

Do teste de ANOVA - uma via, se pode concluir com um nível de confiança de 95 % que não existe uma diferença estatística significativa entre os lipídios totais, peso seco e pigmentos fotossintéticos obtidos no dia 6 e no dia 10 do cultivo (Anexo 2). Por outra parte, a produtividade da biomassa que relaciona a concentração da biomassa com respeito ao tempo de cultivo foi 1.4 vezes maior no dia 6 (40.37 mg/ld) que no dia 10 (28.44 mg/Ld).

Tabela 8 Variáveis de resposta no sexto e décimo dias de cultivo.

	Día 6	E.P Día 6	Día 10	E.P Día 10
Peso seco (mg/L)	242.22	18.19	284.44	12.37
Produtividade (mg/Ld)	*40.37	3.03	*28.44	2.14
Lipídios (%)	23.01	0.71	21.75	0.74
Clorofila A (μg/mL)	2.715	0.06	2.441	0.09
Clorofila C (μg/mL)	0.709	0.04	0.848	0.09
Carotenoides (μg/mL)	2.584	0.07	2.848	0.12

* Resposta estatisticamente significativa, valor p < 0.05
E.P Erro padrão

Como era esperado, se teve um leve aumento no peso seco ao décimo dia de cultivo em comparação com o dia 6, já que no momento da coleta, apesar de que o crescimento foi diminuindo, ainda não tinha alcançado a máxima densidade celular (figura 13).

Na maioria das condições testadas sem réplica, se observou um comportamento similar com respeito à idade do cultivo que a apresentada pelo ponto central. A concentração de clorofila A foi levemente diminuída entre os dias 6 e 10 de cultivo, os carotenóides aumentaram um pouco com o tempo e a produção de lipídios totais foi praticamente igual para cada condição comparada no dia 6 e 10 (gráficos não apresentados). A clorofila C foi a única variável que não apresentou um comportamento característico.

A não mudança na acumulação de lipídios totais entre as idades de cultivo estudadas, pode ser explicada pelo fato que, apesar de que no décimo dia de cultivo a microalga está na fase estacionária, o estresse pelo esgotamento de nutrientes poderia ainda não ser tão elevado para forçar este microrganismo a estocar mais lipídios.

Esta hipótese é sustentada pelos resultados obtidos por Roopnarain *et al* (2014). Os autores reportaram que utilizando uma razão de nitrogênio/fosfato de 6:1 até 24:1 (neste trabalho a razão foi 15:1) no meio de cultivo de *Isochrysis galbana,* a acumulação de lipídios é constante durante os primeiros 12 dias de cultivo (18 %), a partir desse momento, a microalga começa a incrementar exponencialmente o armazenamento dos lipídios como consequência do elevado estresse nutricional (podendo chegar a 40 %). No trabalho feito pelos pesquisadores o comportamento no conteúdo de clorofila, também foi similar ao obtido neste trabalho. Na etapa de crescimento a clorofila aumenta e na etapa estacionária começa a declinar (Roopnarain, Gray, & Sym, 2014).

Huerlimann *et al.* (2014), tampouco encontrou uma diferença significativa na porcentagem de lipídios na fase de crescimento, final de crescimento e estacionária do cultivo de *Iso.galbana*, no entanto, com a microalga *Chromera velia* eles observaram um aumento de 1.9 vezes no porcentagem de lipídios entre a etapa de crescimento e estacionária (Huerlimann et al., 2014b).

Na tabela 9, está detalhado o perfil dos principais ácidos graxos obtidos nas diferentes idades do cultivo. O ácido oleico (O C18:1) aumentou e o ácido α linolênico, precursor dos ômega 3, (ALA C18:3 ω3) diminuiu ao décimo dia do cultivo com respeito à etapa final de crescimento no dia 6. O EPA foi identificado em uma baixa porcentagem e o DHA não foi afetado significativamente pela idade do cultivo.

Com respeito aos somatórios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, a biomassa da microalga coletada no dia 10 expõe um perfil de ácidos graxos com maior porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados, comparada com a biomassa obtida no dia 6. No entanto, os ácidos graxos saturados e poli-insaturados não mostraram uma forte variação.

Na análise do perfil de ácidos graxos de *Isochrysis galbana* (TISO) coletada na etapa final da fase exponencial e final da pós-exponencial (estacionária) feita por Tzovenis *et al*. (1997), mostrou que a produção de DHA diminui com respeito à idade de cultivo, o que difere com o encontrado neste trabalho (I Tzovenis et al., 1997).

No entanto, resultados similares aos obtidos foram reportados por Huerlimann *et al*. (2014). Eles estudaram o efeito da presença ou ausência do nitrogênio e a idade de cultivo na expressão de quatro enzimas dessaturases (Δ4, Δ5, Δ6 e Δ8) presentes na microalga

Isochrysis galbana. Os autores citaram que o DHA não mostrou mudanças com as diferentes etapas do cultivo e os tratamentos de nitrogênio. Mas, na etapa de crescimento conseguiram uma maior porcentagem de poli-insaturados, especialmente do ácido graxo estearidônico (SDA C18:4) e na etapa estacionária se gerou um aumento de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, especialmente o ácido palmítico e oleico (O C18:1).

Huerlimann *et al*. (2014) reportaram que o incremento do O C18:1 na etapa estacionária pode ser explicado pelo decréscimo na sínteses de poli-insaturados, já que nesta etapa, se gera baixos níveis dos precursores de ômega 3 e 6 (LA e ALA) e existe uma diminuição da expressão das enzimas dessaturases Δ4, Δ5 e Δ8 quando o nitrogênio é esgotado (Huerlimann et al., 2014a).

Tabela 9 Perfil de ácidos graxos nos dias 6 e 10 de cultivo.

Día	**C14:0**	**C16:0**	**C16:1**	**C18:1 trans**	**C18:1 Cis**	**C18:2 Cis ω6**	aC18:**3 ω3**	Des	C20:5 ω3	C22:**6 ω3**	Out.
6	27.18 ± 0.35	13.41 ± 1.64	3.30 ± 0.22	**19.72*** ± 0.38	0.98 ±0.36	3.29 ±0.09	**5.60*** ± 0.55	14.67 ± 1.78	0.73 ± 0.06	9.23 ± 0.29	1.90
10	25.31 ± 0.35	12.08 ± 0.27	2.74 ± 0.04	**25.06*** ± 0.79	1.27 ±0.04	2.82 ±0.05	**3.90*** ± 0.07	14.49 ± 0.38	0.78 ± 0.05	9.88 ± 0.27	1.67

Somatório

Dia	**Saturado**	**Monoinsaturado**	**Poli-insaturado ω 3[a]**	**Poli-insaturado ω 6**	**Total poli-insaturado[a]**
6	41.69 ± 2.18	**24.41*** ± 0.72	15.56 ± 0.65	3.64 ± 0.19	19.20 ± 0.63
10	38.13 ± 0.67	**29.59*** ± 0.56	14.79 ± 0.19	2.99 ± 0.09	17.78 ± 0.27

* Anova estatisticamente significativa (valor $p<0.05$)
[a] Não se teve em conta a porcentagem do pico desconhecido (Des)

Com base no aumento na produtividade de biomassa obtida, maior porcentagem de ALA e em vista que as duas etapas do cultivo avaliadas não tiveram uma implicação na porcentagem de acumulação de lipídios, DHA, poli-insaturados e que na etapa final de crescimento é o momento ideal para a coleta da microalga evitando uma limitação grave de nutrientes, especialmente de nitrogênio, o tempo de cultivo para o segundo planejamento de experimentos foi diminuído até o sexto dia. Portanto, as análises para as condições de cultivo na primeira etapa foram feitas para a etapa final de crescimento.

5.1.3 Lipídios totais

A variação na acumulação de lipídios totais nas diferentes condições de salinidade, aeração e intensidade luminosa são apresentadas na Figura 15. No final da etapa de

crescimento, a porcentagem de lipídios totais variou entre 12.44 % até 26.8 %, indicando que os parâmetros avaliados são importantes para a mudança desta resposta.

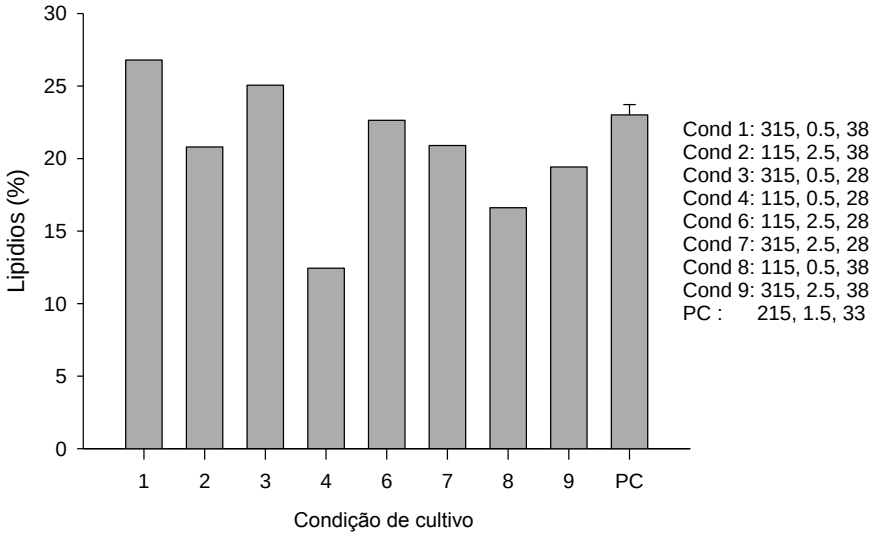


Figura 15 Porcentagem de lipídios no dia 6 de cultivo

Conforme a figura 16 das médias marginais e a análise estatística (anexo 2), a interação inversa entre as variáveis aeração-intensidade luminosa foi o fator que teve maior efeito significativo na acumulação de lipídios na microalga, seguido da intensidade luminosa por si só. Em outras palavras, as interações de maior intensidade luminosa-menor aeração e menor intensidade luminosa-maior aeração foram as condições de cultivo que apresentaram os mais altos porcentagem de lipídios totais, sendo ainda superior nas condições com a maior intensidade luminosa avaliada neste trabalho, onde foram acumulados entre 25 % e 26.8 % de lipídios totais. A menor acumulação de lipídios de 12. 44 % foi alcançada utilizando uma intensidade de luz de 115 µmol fotons/m^2s, aeração de 0.5 vvm e salinidade de 28 g/L.

Na pesquisa feita por He et al. (2015) concluíram que, nos cultivos com iluminação contínua das microalgas *Chorella* sp e *Monoraphidium dybowskii*, o aumento na intensidade luminosa de 40 até 400 µmol fotons/m^2s também gerou um aumento na acumulação de lipídios, embora a produtividade de biomassa e, portanto, a produtividade de lipídios, começou a diminuir quando foram atingidas intensidades luminosas maiores que 200 µmol fotons/m^2s que corresponde ao 10 % da intensidade solar.

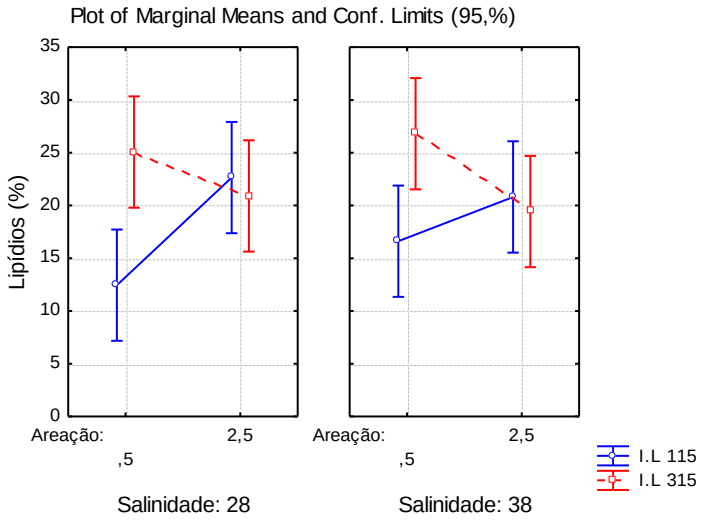


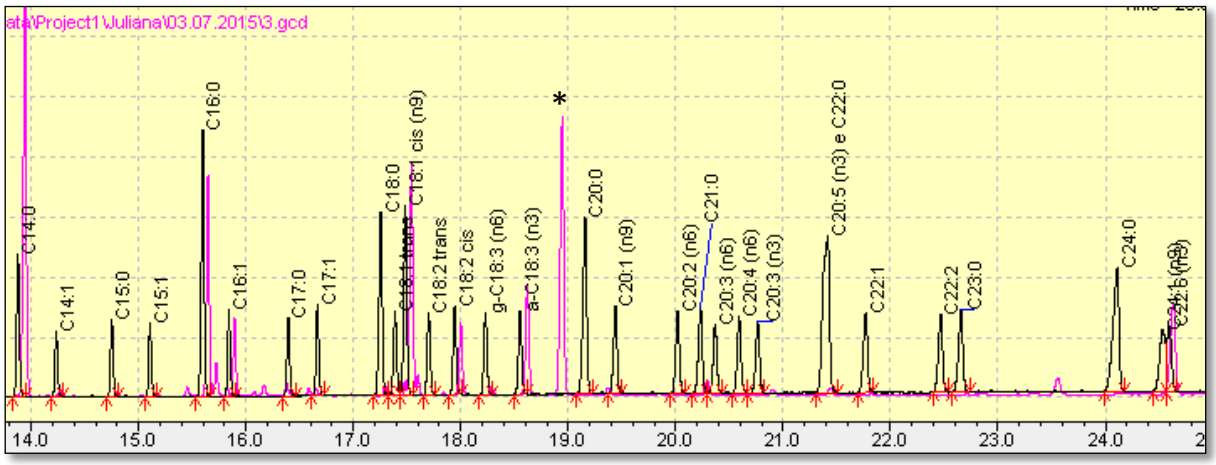
Figura 16 Médias marginais para lipídios no dia 6 de Cultivo

Não foi encontrado nenhum reporte da interação entre a intensidade luminosa e aeração ou o efeito do aumento na vazão de ar com respeito à acumulação de lipídios. Carvalho e Malcata (2005) também concordaram que um aumento na intensidade de luz afeta positivamente a acumulação de lipídios utilizando a microalga *Pavlova lutheri*, da mesma forma como acontece com um acréscimo na disponibilidade de CO_2. As outras variáveis estudadas, salinidade e aeração, e suas respetivas interações não provocaram uma grande mudança neste parâmetro.

5.1.4 Perfil de ácidos graxos

Ao analisar a tabela 10 de perfil de ácidos graxos, se observa que dentre os seis ácidos que apresentaram maior porcentagem em todos os diferentes cultivos estudados estão: o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (O C18:1), o ácido α linolênico (ALA C18:3), o ácido docosahexaenóico (DHA C22:6) e um ácido graxo que não foi identificado entre os ácidos graxos conhecidos no mix padrão (Des). No entanto, conforme o encontrado na literatura como ácido graxo característico das microalgas do grupo Prymnesiophyta, entre elas *Isocrhysis galbana*, e pela posição e tempo de saída na serie homologa no cromatograma da figura 17, se poderia pensar que esse ácido graxo é o ácido estearidônico (SDA C18:4), que também faz parte do grupo de ácidos graxos ômega 3 (Brown et al., 1993; Huerlimann et al., 2014a; Lin et al., 2007; Liu & Lin, 2001).

O ácido eicosapentaenóico (EPA) foi detectado numa baixa porcentagem, pelo qual se considera que a espécie de *Isochrysis galbana* com a qual se trabalhou é produtora especifica do ácido graxo essencial docosahexaenóico (DHA).



* Ácido graxo desconhecido
Os picos em preto representam o mix padrão e os picos em rosa uma amostra obtida experimentalmente

Figura 17 Cromatograma do perfil de ácidos graxos característico dos cultivos fotoautotróficos de *Isochrysis galbana*

Na maioria dos relatos que avaliam a intensidade de luz sobre o perfil lipídico em diferentes tipos de microalgas marinhas, concordam em que a alta acumulação de DHA está relacionada com o aumento da intensidade luminosa a níveis superiores da saturação e, baixos níveis de intensidade luminosa, são relacionados com o incremento no conteúdo de EPA e de PUFAs. Segundo Tzovenis *et al*. (2003), no cultivo de *Isochrysis galbana* coletada na etapa exponencial, a acumulação de DHA é mais dependente ao regime de luz:escuridão que à intensidade luminosa, mas o aumento neste último parâmetro provocou um leve acréscimo no DHA em relação ao total de ácidos graxos identificados na microalga, que variou de 11.74 % em 120 µmol fotons/m^{2}s até 14.14 % em 460 µmol fotons/m^{2}s (Ioannis Tzovenis et al., 2003).

Conforme os resultados obtidos no trabalho, nas diferentes condições testadas não é mostrada uma diferença significativa na porcentagem de DHA nem de PUFAs que seja relacionada com a variação da intensidade luminosa e sua interação com os outros fatores (Anexo 2). Segundo Brown *et al*. (1993) e Molina *et al.* (1992) no intervalo de 50 – 250 µmol fotons/m^{2}s a porcentagem de DHA não apresenta diferenças significativas, mas o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 diminui (Brown et al., 1993; Grima et al., 1992).

Pelo contrário ao esperado, no intervalo avaliado se gerou uma curvatura mínima significativa para o porcentagem de DHA e das PUFAs. Mas, nenhum dos parâmetros estudados foi considerado significativo para a mudança destas respostas. O anterior pode ser esclarecido devido a que no experimento não se tinha um controle estrito sobre a temperatura de cada Erlenmeyer, por isso, as condições que estavam a maiores intensidades de luz e mais afastadas do ar condicionado podiam estar a uma temperatura superior (entre 25 e 26 °C) o que possibilitaria a ligeira diminuição da porcentagem de DHA e PUFAs. Outra justificativa que poderia ter causado a curvatura mínima é que a interação entre os fatores, principalmente salinidade-intensidade luminosa, não favoreceu a resposta no ponto central. Por outra parte, devido a que a variação na porcentagem de DHA e PUFA foi leve, poderia ser necessária uma duplicata dos níveis superiores e inferiores do planejamento para corroborar a significância da curvatura.

No diagrama de médias marginais (figura 18), se pode observar que a salinidade (Valor p = 0.058) foi a variável mais próxima a ser significativa para a alteração na porcentagem de DHA. O aumento da salinidade de 28 a 38 g/l provocou um incremento na acumulação de DHA, alcançando uma porcentagem máxima de 13.2 % e, de PUFA, de 48.16 % usando a intensidade luminosa de 115 μmolfotons/m^2s, alta aeração de 2.5 vvm e alta salinidade de 38 g/L. No trabalho feito por Liu *et al* (2001) onde avaliaram o efeito da salinidade do cultivo de *Isochrysis galbana* num intervalo de 0.8 % até 3.2 % de NaCl, encontraram que um conteúdo de lipídios com altas quantidades de PUFA e DHA de 39.6 % e 11.2 % respetivamente foram obtidas com a maior salinidade.

Ao contrario do esperado, já que o processo de dessaturação é aeróbio, a variação na vazão de ar resultou ser um parâmetro pouco importante para otimizar a produção de PUFAs e DHA. Tem-se poucos relatos do efeito da aeração no perfil lipídico, Molina *et al.* (1992) utilizando a microalga *Isochrysis galbana* Parke viram que um aumento na aeração gerou uma diminuição dos ácidos graxos poli-insaturados, especialmente do EPA, mas o DHA não foi influenciado pela variação neste parâmetro. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a necessidade de oxigênio para a síntese de PUFAs de cadeia longa no metabolismo de *Isochrysis galbana* é baixa.

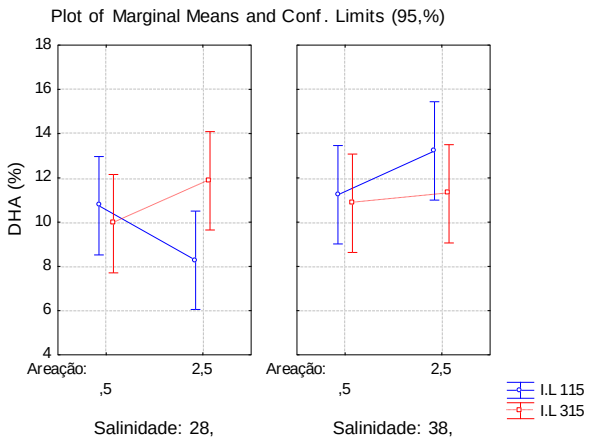


Figura 18 Médias marginais para DHA no dia 6 de Cultivo

Com respeito aos outros ácidos graxos destacados, o ácido mirístico (C14:0) teve um aumento importante de 16.79 % até 28.87 % com o incremento da aeração, a interação positiva dos três fatores, principalmente da intensidade luminosa- aeração e a menor concentração de sal. A produção do ácido oleico (C18:1) foi estimulada diretamente pela intensidade de luminosa e a relação inversa entre a intensidade luminosa – salinidade, alcançando sua máxima acumulação de 20.22 % em condições de cultivo de 315 µmol fotons/m^2s, 0.5 vvm e 28 g/L de sal.

Finalmente, a somatória total dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados não variaram entre os diferentes condições testadas. De maneira similar ao obtido por Zang *et al.* (2013) na maioria dos experimentos se conseguiu um perfil de ácidos graxos padrão de PUFA>SAFA>MUFA.

Tabela 10 Perfil de ácidos graxos sob diferentes intensidades luminosas, salinidade e aeração.

Ácido graxo	Condições de cultivo									
	315 µmol fotons/m2 s				115 µmol fotons/m2 s				215 µmol fotons/m2 s	E.P PC
	0,5 vvm		2,5 vvm		0,5 vvm		2,5 vvm		1,5 vvm	
	28 g/L	38 g/L	28 g/L	38 g/L	28 g/L	38 g/L	28 g/L	38 g/L	33 g/L	
C14:0*	22,51	16,80	26,83	28,88	20,72	23,19	26,99	19,13	27,18	0,35
C16:0	11,75	13,55	11,23	9,71	10,03	11,91	11,10	10,30	13,41	1,64
C16:1	4,03	4,36	3,19	3,55	4,47	4,10	2,70	3,16	3,30	0,22
C18:0	-	2,29	0,98	-	-	-	-	-	2,16	
C18:1 trans *	20,23	16,63	18,18	17,74	14,26	15,42	14,69	17,39	19,72	0,38
C18:1Cis	0,97	1,70	0,45	-	1,03	0,62	0,84	0,46	0,98	0,36
C18:2Cis n6	2,46	3,48	2,32	2,77	3,68	3,43	3,50	3,75	3,20	0,09
gC18:3 n6	-	-	-	-	-	-	-	1,25	-	
aC18:3 n3	6,59	7,22	4,44	3,95	7,25	5,46	5,30	7,09	5,60	0,55
C18:4	18,87	20,50	17,81	19,95	23,08	24,64	20,06	20,82	14,67	1,79
C20:1 n9	-	-	1,07	-	1,51	-	-	-	1,24	
C20:2 n6	0,59	-	0,70	0,39	0,70	-	-	-	0,45	0,14
C20:3 n6	1,14	1,72	-	-	1,18	-	1,50	1,36	0,42	
C20:5 n3 + C22:0	0,94	0,89	0,94	0,63	0,88	-	1,59	0,66	0,73	0,06
C24:0	-	-	-	-	-	-	3,45	-	-	
C22:6 n3	9,93	10,85	11,87	11,28	10,74	11,24	8,28	13,22	9,23	0,30
SAFA	34,26	32,64	39,04	39,17	31,23	35,10	41,54	30,82	43,89	2,18
MUFA	25,23	22,69	22,89	21,29	21,27	20,14	18,23	21,02	25,24	0,72
Poliinsaturados n6	4,19	5,20	3,01	3,16	5,56	3,43	5,01	6,37	4,07	0,65
Poliinsaturados n3	36,33	39,46	35,05	35,81	41,94	41,34	35,22	41,80	30,23	0,19
Poliinsaturados	40,51	44,66	38,06	38,97	47,50	44,77	40,23	48,16	34,31	1,72

*estatisticamente significativo (Valor p <0.05)
EP Erro padrão
PC Ponto central

5.1.5 Interposição de superfícies

Como não se obteve uma curvatura máxima significativa para aumentar a porcentagem de poli-insaturados do tipo ômega 3, entre eles o DHA, se fez outro planejamento de experimentos baseado nos resultados obtidos. Para isso, e com a finalidade de não afetar outras variáveis de resposta importantes como porcentagem de lipídios totais, crescimento e concentração de biomassa, foi utilizada a função de otimização *Desirability* do software estatístico Statistica 7. A função é fundamentada num modelo matemático que permite interpor, simultaneamente, mais de duas respostas experimentais visando predizer a melhor combinação dos parâmetros testados, satisfazendo as condições desejáveis para cada variável de resposta. A função estima um valor que varia entre 0 e 100% de acordo com a porcentagem em que podem ser satisfeitas as condições concomitantemente.

Chauton *et al.*(2015) em sua analise econômica reportaram que um aumento no conteúdo total de EPA e DHA nas células poderia ser mais importante que o aumento na produção da biomassa, porque o conteúdo total destes poli-insaturados tem um maior impacto nos custos de produção (Chauton et al., 2015). Porém, para obter a maior produtividade de ácidos graxos poli-insaturados é preciso ter um equilíbrio entre a concentração de biomassa e o porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados gerados, os quais são dependentes da porcentagem de lipídios saponificáveis.

Com base no supracitado, para a otimização nesta fase foi dado um maior peso de desejo (no intervalo de 0 - 1) nas respostas de porcentagem de DHA e de PUFAs do tipo ômega 3 (valor de 1) que para a porcentagem de lipídios, crescimento cel/mL e peso seco da biomassa (valor de 0.8).

Nas figuras 19, 20 e 21 são apresentadas as superfícies de respostas e curvas de níveis geradas com a função de otimização *Desirability*. Nestes gráficos, pode-se corroborar a não existência de uma curvatura máxima, e que, a melhor condição de cultivo para levar a um aumento das repostas desejáveis satisfeitas em 70 %, é uma aeração de 2.5 vvm, uma intensidade luminosa baixa de 115 μmol fotons/m^2s e uma salinidade de 38 g/L. Deste modo, seria atingida uma concentração de biomassa de 220 mg/L, 20.8 % de lipídios, 13.21 % de DHA e uma acumulação de 41.79 % de poli-insaturados do tipo ômega 3.

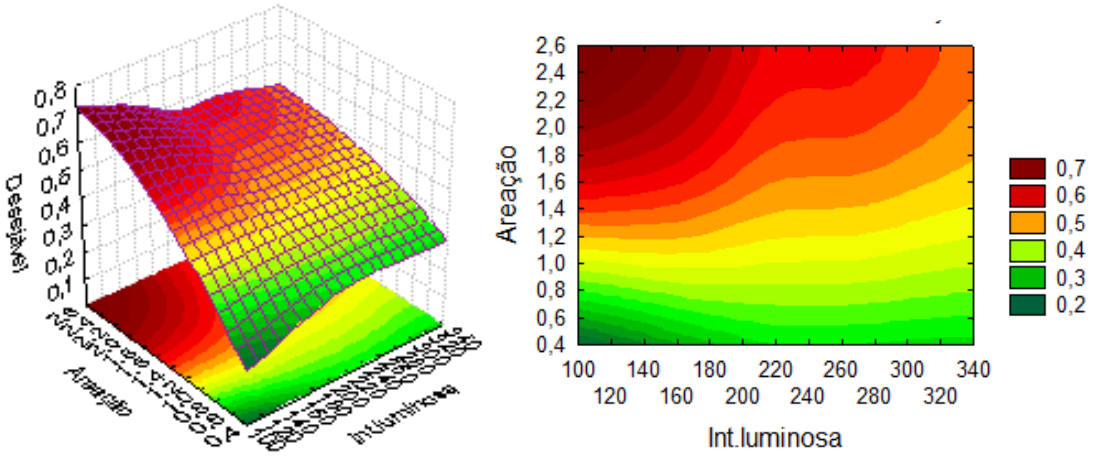


Figura 19 Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para otimização simultânea de % de DHA, poli-insaturados ômega 3, lipídios totais e concentração de biomassa para a aeração e intensidade luminosa

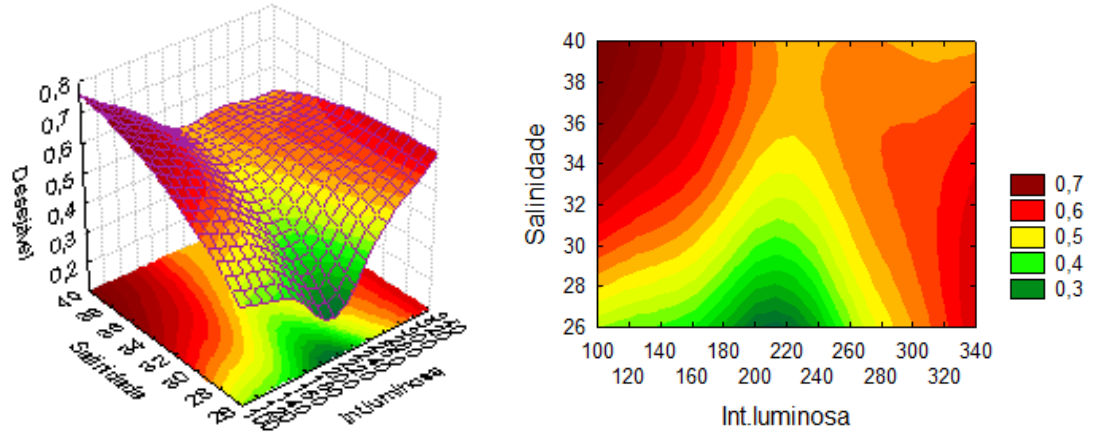


Figura 20 Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para otimização simultânea de % de DHA, poli-insaturados ômega 3, lipídios totais e concentração de biomassa para a salinidade e intensidade luminosa

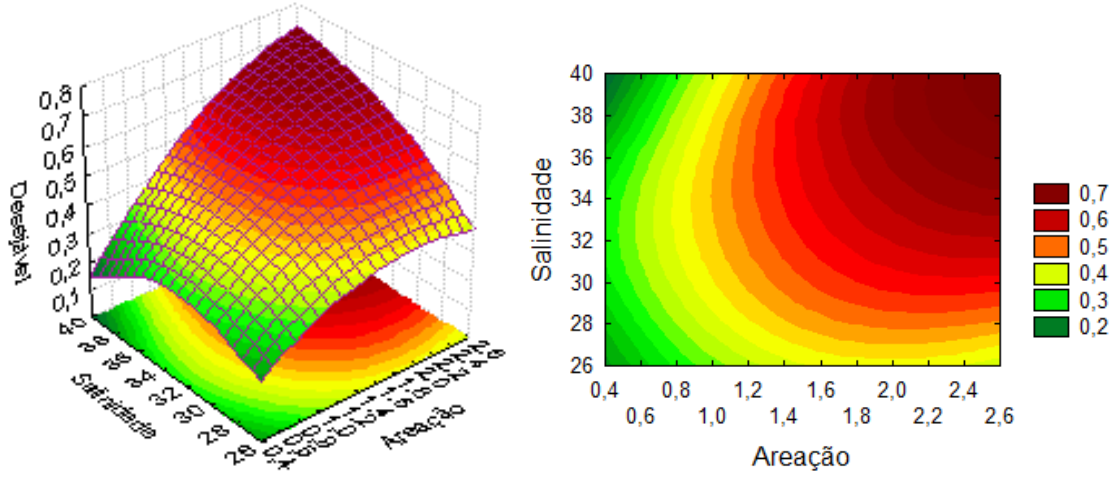


Figura 21Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para otimização simultânea de % de DHA, poli-insaturados ômega 3, lipídios totais e concentração de biomassa para a salinidade e aeração

Para dar continuidade ao segundo desenho experimental, a vazão de ar foi fixada em 2.5 vvm (4L/min de ar). Embora a aeração seja uma variável importante para o crescimento, não influenciou muito a produção de PUFAs. Molina *et al* (1992) citou que nas vazões de ar superiores a 2.5 vvm a difusão de $CO_{2gás}$ a CO_{2liq} no meio de cultivo não aumenta, o que significa que com esta vazão de ar comprimido é gerada a máxima produção de biomassa.

No entanto, o principal argumento para a fixação desta variável, é pelo fato de que um aumento a níveis superiores de 2.5 vvm causa danos graves nas células de *Isochrysis galbana*, já que, esta microalga é sensível a estresses mecânicos e de turbulência porque não tem parede celular para sua proteção. Isso foi corroborado nos testes feitos a vazões de ar superiores, onde se observou uma decantação da célula por causa da perda do flagelo e células mortas provocado pela turbulência.

Finalmente, o intervalo de salinidade foi aumentado a partir de 40 até 55 g/L e o intervalo de intensidade luminosa foi diminuída desde 130 μmol até 38 μmol fotons/m^2s.

5.2 SEGUNDA ETAPA

5.2.1 Cinética de crescimento e biomassa seca

A microalga estudada teve a capacidade de crescer em todos os tratamentos estudados. A figura 22 exibe as curvas de crescimento de *Isochrysis galbana* sob as diferentes intensidades luminosas e salinidades avalidas. Na medida em que vai decrescendo a intensidade luminosa e aumentando a salinidade, a microalga apresentou uma fase de adaptação mais prolongada como era esperado, de até 48 h de cultivo para as condições de 38 μmol fotons/m^2s e salinidade de 47 – 55 g/L.

A taxa de crescimento e biomassa obtidas foram afetadas significativamente pelos três níveis de intensidade luminosa. O aumento na salinidade não provocou uma grande mudança nestas respostas, como pode ser conferido mediante as figuras 23 e 24 de concentração de biomassa total e médias marginais. Todos os tratamentos com iguais intensidades luminosas tiveram uma taxa de crescimento similar na fase exponencial de cultivo, apresentando valores de μ =0.4, 0.31 e 0.25 d^{-1} para 130, 67 e 38 μmol fotons/m^2s, respectivamente. Isto evidencia que a diminuição neste parâmetro é desfavorável para o crescimento, apresentando uma limitação luminosa.

Segundo o encontrado por Lin *et al*. (2007), o crescimento de *Isocrhysis galbana* CCMP 1324 sob intensidades luminosas menores de 100 µmol fotons/m^{2}s e maiores que 500 µmol fotons/m^{2}s exibiram um baixo crescimento e produção de biomassa, associadas a uma limitação e fotoinibição luminosa. Os autores também reportaram que a intensidades luminosas maiores de 500 µmol fotons/m^{2}s as células sofrem apoptose celular aos poucos dias de iniciado o cultivo.

O aumento de intensidade luminosa (até nível de saturação) impacto positivamente na produtividade de biomassa, na taxa de fixação de CO_2 e no acumulo de carboidratos em *Scenedesmus obliquus.*

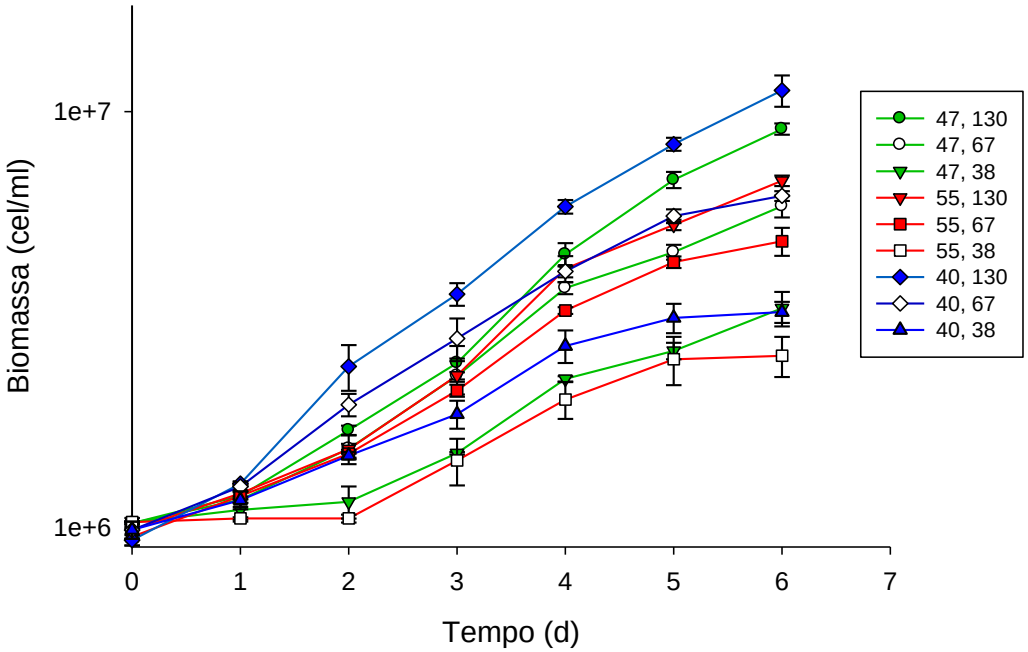


Figura 22 Cinética de crescimento de *Isochrysis galbana* sob diferentes intensidades luminosas e salinidade

Nesta etapa, a concentração de biomassa final variou de 110 mg/L até 244 mg/L, sendo o peso seco das condições de menor intensidade luminosa significativamente menor que ao obtido nas outras intensidades. Uma concentração de biomassa similar à encontrada no trabalho em intensidades luminosas baixas, foi reportada por Yoshioka *et al* (2012) e Brown *et al* (1993), os quais cultivaram a microalga com luz contínua a uma intensidade de 50 µmol fotons/m^{2}s (Brown et al., 1993; Yoshioka et al., 2012).

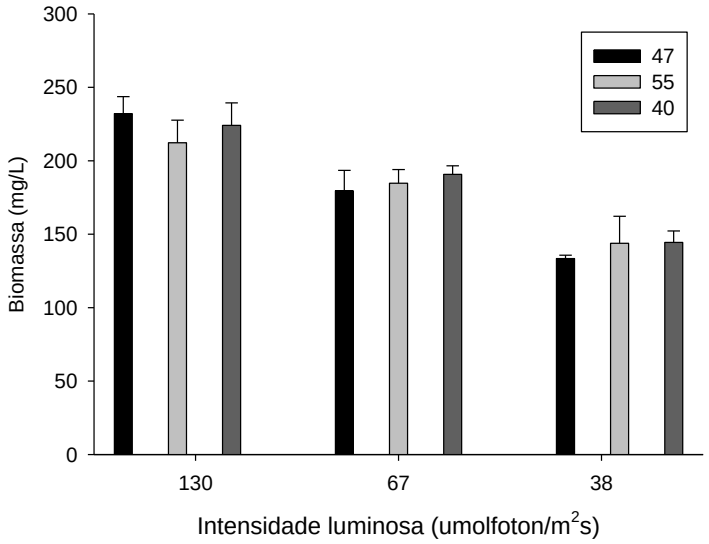


Figura 23 Concentração de biomassa de *Isochrysis galbana* obtida sob diferentes intensidades luminosas e salinidade

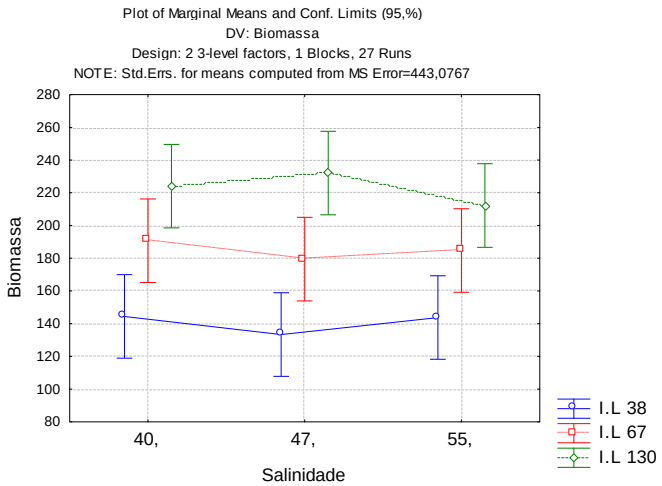


Figura 24 Médias marginais da concentração de biomassa (mg/L)

5.2.2 Lipídios totais

A intensidade luminosa também foi o parâmetro mais importante para a variação na acumulação de lipídios totais, de forma semelhante como o reportado por Brown *et al.* (1993), o aumento na porcentagem de lipídios foi devida a um aumento na intensidade luminosa entre 50 – 100 µmol fotons/m^2s (Brown et al., 1993). Nas condições estudadas, a salinidade e a interação entre fatores não foram estatisticamente significativas, no entanto, nas Figuras 25 e

26 de médias marginais se pode verificar que uma diminuição na salinidade favorece o aumento no conteúdo de lipídios.

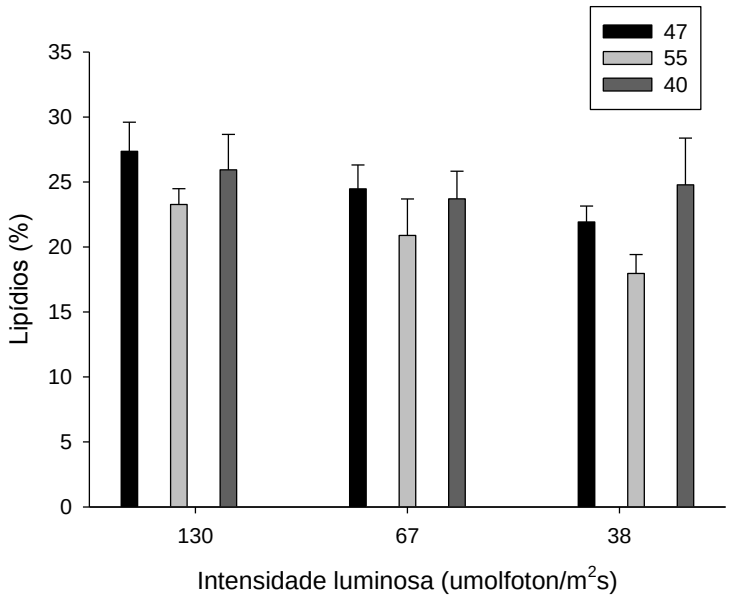


Figura 25 Porcentagem de lipídios totais em *Isochrysis galbana* obtida sob diferentes intensidades luminosas e salinidade

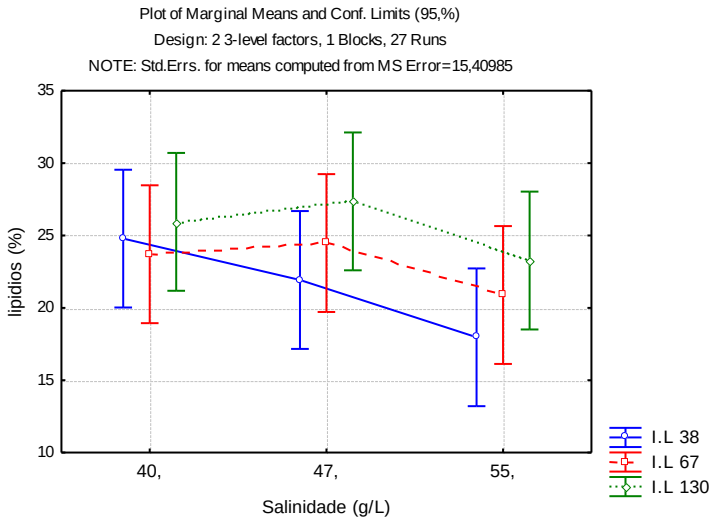


Figura 26 Médias marginais de lipídios totais em Isochrysis galbana obtidas sob diferentes intensidades luminosas e salinidade

5.2.3 Perfil de ácidos graxos

O efeito positivo da produção de DHA, poli-insaturados tipo ômega 3 e poli-insaturados totais no intervalo estudado, foram mais sensíveis a um aumento na intensidade luminosa que a um incremento na concentração de sal, segundo visto na Tabela 11.

Tabela 11 Perfil de ácidos graxos sob diferentes intensidades luminosas e salinidade

Média ácidos graxos	Intensidade luminosa (µmol foton/m^2 s)								
	130			67			38		
	Salinidade (g/L)			Salinidade (g/L)			Salinidade (g/L)		
	40	47	55	40	47	55	40	47	55
C14:0*	24,72 ± 0,31	20,6±0,73	20,73±0,28	23,32± 0,94	23,04±0,71	21,64±0,28	23,76± 1,91	22,42±0,53	21,64± 0,31
C16:0*	11,23±0,31	11,01±0,59	11,25±0,75	11,46± 0,50	11,96±0,29	12,57±0,81	13,64± 1,10	12,66±0,27	13,55±1,03
C16:1*	3,40± 0,41	3,44±0,22	3,11±0,27	4,55± 0,20	5,21±0,32	3,78±0,31	4,89± 0,08	5,42±0,06	4,47±0,38
C18:0	0,49± 0,14	0,29	-	0,95± 0,14	-	0,99± 0,22	0,71	-	0,72
C18:1*	16,38± 0,87	15,23±1,11	14,02±0,89	14,31± 0,94	16,94±0,78	13,42±0,73	16,10±1,35	17,89±0,15	15,25±0,94
C18:2 trans	0,93± 0,27	0,79±0,16	0,50±0,07	1,28± 0,07	1,46±0,046	0,84± 0,05	1,09±0,20	1,42±0,23	0,88±0,04
C18:2Cis*	4,19± 1,06	4,048±0,24	4,16±0,43	6,18± 1,03	6,39±0,37	3,99± 0,05	6,63±0,71	6,89±0,23	5,62± 0,47
gC18:3 ω6	0,34± 0,04	0,85±0,20	1,05±0,24	0,53± 0,14	0,71±0,01	0,77±0,11	0,69	0,72±0,21	0,67±0,11
aC18:3 ω3*	5,57± 0,23	6,95±0,23	5,75±0,34	8,35± 0,55	7,64±0,34	5,69± 0,32	7,59±0,33	6,78±0,23	5,65±0,27
"C18:4"*	17,93± 1,56	21,37±0,65	21,92±0,88	16,31± 0,78	16,95±1,19	21,05±0,98	15,26±1,43	16,52±0,45	20,95±0,48
C20:1 ω9	0,90 ± 0,26	1,176±0,05	2,48±0,67	1,69± 0,63	0,89±0,30	1,71±0,73	1,67	1,04±0,12	0,80
C20:3 ω6	1,05	1,36	1,12±0,38	0,88± 0,63	-	1,28±0,22	1,01±0,44	0,13	2,26
C20:5 ω3 + C22:0	0,57± 0,03	0,65±0,04	0,67±0,03	0,56± 0,06	0,56±0,05	0,63±0,02	0,56±0,09	0,76±0,03	0,58±0,01
C22:6 ω3	11,84± 0,28	12,42±0,04	13,66±0,62	9,34± 0,54	7,37±0,80	11,62±0,19	7,53±0,72	6,22±0,16	9,28±0,21
SAFA*	36,64 ± 0,75	32,41±1,31	31,98±0,47	35,72± 1,64	35,84±1,17	35,71± 1,20	37,99±1,76	36,10±0,70	35,60±0,60
MUFA*	20,99± 0,94	19,73±0,70	19,71±0,75	20,48± 0,53	22,95±1,20	18,75± 0,33	21,86±1,53	24,58±0,08	20,13±0,85
PUFA ω3*	36,20± 1,61	41,41±0,52	42,01±0,73	34,79± 1,43	32,68±1,66	39,23± 1,46	30,76±2,42	30,28±0,45	36,33±1,01
PUFA ω6	5,12 ± 0,58	5,35±0,53	5,61±0,73	7,30± 0,96	6,86±0,45	5,45± 0,45	7,86±0,82	7,42±0,43	6,82±0,48
Total poliinsaturados*	41,32± 1,58	46,76±0,77	47,62±1,19	42,10± 1,76	39,54±1,29	44,68±1,45	38,62±2,89	37,70±0,30	43,15±1,48
Prporção 3/6*	7,26 ± 0,89	7,88±0,76	7,87±1,14	4,92± 0,60	4,83±0,52	7,29± 0,65	3,97±0,36	4,12±0,30	5,35±0,22

*estatisticamente significativo (Valor p <0.05)

Para o ácido SDA (C18:4) o efeito foi similar, mas a variável mais relevante foi a salinidade. Os dois parâmetros foram importantes, entretanto sua interação não gerou uma mudança em nenhuma destas respostas. A máxima acumulação de DHA e de ácidos graxos poli-insaturados foi de 13.66 % e 47.62 % respetivamente, obtidas com a condição de cultivo de 130 μmol fotons/m^2s e a uma salinidade de 55 g/L

As mais baixas intensidades luminosas e salinidade provocaram uma diminuição na porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados e DHA. Segundo o reportado na literatura, a porcentagem de DHA diminui com a diminuição da intensidade luminosa num intervalo menor que o ponto da saturação luminosa, o que bate com o encontrado na pesquisa. Por outro lado, a porcentagem de poli-insaturados deveria aumentar com a diminuição da intensidade luminosa o que difere com o obtido. Esta discrepância pode ser explicada pelo crescimento da microalga, porque nas intensidades luminosas menores a fase de adaptação demorou 2 dias. Portanto, no momento da coleta, a microalga parecia ainda estar em uma etapa precoce do crescimento exponencial, pelo qual nestas ultimas condições estudadas, a coleta da biomassa foi feita em diferentes fases de crescimento, o que pode gerar uma variação nas respostas esperadas.

A interação entre fatores, salinidade e intensidade luminosa, resultaram ser importantes para o comportamento do ácido α linolênico (C18:3), a maior porcentagem deste ácido graxo foi alcançado com uma intensidade de luz de 67 μmol fotons/m^2s e salinidade de 47 g/L.

Os ácidos graxos saturados totais apresentaram um comportamento oposto aos ácidos graxos poli-insaturados totais. Esta resposta foi mais afetada pela intensidade luminosa que pela salinidade, mas os dois parâmetros foram significativos, a diminuição da intensidade luminosa e salinidade impulsionou sua porcentagem de acumulação até 37 %. Entre os dois mais importantes ácidos graxos saturados está o C16:0 e o C14:0. O primeiro foi afetado significativamente pela intensidade de luz, mas não pela salinidade e o segundo foi mais sensível na resposta para a salinidade que para intensidade de luz.

Conforme Webb e Chu *et al.* (1983) a proporção de ômega 3/ômega 6 é um dos parâmetros que representa a qualidade nutricional da biomassa, microalgas com uma razão no intervalo de 2 ou 5 são consideradas ideais para seu uso na aquicultura. No trabalho, o único parâmetro que afetou significativamente esta proporção foi a intensidade luminosa, que em

níveis de 130 µmol fotons/m^{2}s, sem importar a salinidade, geraram a máxima razão de 7.8. Finalmente, esta proporção de ômega 3/ômega 6 no perfil de ácidos graxos de *Isochrysis galbana* em todas as condições testadas estiveram num intervalo de 4 - 7.8.

Tzovenis et al. (2003) determinou que sob uma condição de luz escuridão de 12:12 h sobre diferentes intensidades luminosas no intervalo de 120 – 460 µmol fotons/m^{2}s a proporção de ômega 3/ômega 6 varia aproximadamente entre 5 a 9. Lin *et al*. (2007) obtiveram uma razão ômega 3/ômega 6 de 3.7- 4.8 na fase de crescimento e estacionária precoce. Estes resultados são consistentes com o conseguido na pesquisa, e comprovaram o potencial da microalga como produtora de ácidos poli-insaturados do tipo ômega 3 de boas qualidades nutricionais.

5.2.4 Outras respostas bioquimicas

Carboidratos

Os carboidratos foram afetados significativamente pelos dois parâmetros independentes (Anexo 2), mas sua interação não provocou uma mudança na porcentagem de carboidratos. Com base no obtido, um aumento na salinidade e baixa intensidade luminosa gera uma diminuição na porcentagem de carboidratos. Na figura 27, é perceptível que a maior porcentagem de carboidratos foi de 15 %. Este resultado é superior a alcançado por Brown *et al* (1993) de 8 % com intensidade luminosa de 100 µmol fotons/m^{2}s, e inferior ao obtido por Picardo *et al.* (2013) de 30 % de carboidratos com intensidade de luz de 70 µmol fotons/m^{2}s (Brown et al., 1993; Picardo et al., 2013).

Um comportamento similar no aumento de carboidratos foram obtidos por Ho *et al*. (2012) e Sukenik (1991) utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus* e *Isochrysis galbana*, respectivamente. Os autores reportaram que a produção e a produtividade de carboidratos incrementaram com o aumento na intensidade luminosa até níveis de 400 µmol fótons/m^{2}s onde ainda não é apresentada a fotoinibição.

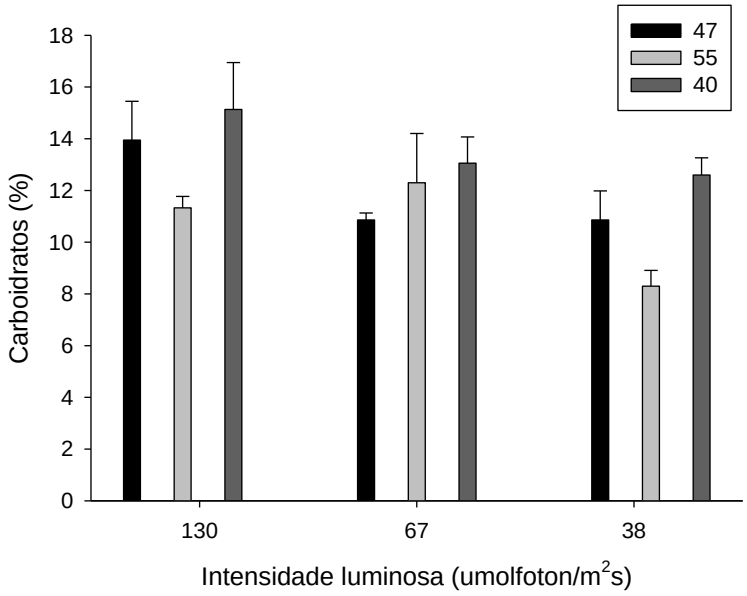


Figura 27 Porcentagem de carboidratos em *Isochrysis galbana* obtida sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade

Pigmentos fotossintéticos

Todos os pigmentos fotossintéticos em termos de µg/mL nas condições testadas, aumentaram de forma proporcional com o acréscimo na intensidade luminosa provocando uma variação de 1.42 até 3.98 µg/mL para a clorofila A; de 0.47 até 1.15 µg/mL para a clorofila C e de 1.10 até 2.95 µg/mL para os carotenóides como é descrito na tabela 12.

No cultivo de *Isochrysis galbana* em F/2, Liu *et al* (2001) reportam uma concentração de pigmentos fotossintéticos de Clorofila A de 2.8 µg/mL e de Clorofila C de 1.4 µg/mL e Mesquita (2012) obteve quantidades de clorofila A, C e carotenoides de 3.28, 1.16 e 6.38 µg/mL respetivamente em 8 dias de cultivo. Contudo, segundo o encontrado por Campos *et al* (2010) aos 12 dias de cultivo em meio Conway, *Isochrysis galbana* apresentou um conteúdo de clorofila A e carotenoides de 0.32 e 0.10 µg/mL (Campos & Barbarino, 2010; Liu & Lin, 2001; Mesquita, 2013). Os resultados de clorofila A e C da literatura, batem com os obtidos neste trabalho para cultivos com meios F/2 nas condições de maior intensidade luminosa e salinidade de 40 - 47 g/L. Todavia, a concentração de carotenóides foi menor quando comparada com Mesquita (2012). Por outra parte, estes resultados foram maiores que o apresentado por Campos *et al* (2010), o que evidencia que o conteúdo de pigmentos varia mediante a alterações do meio e das condições de cultivo.

A clorofila A faz parte dos produtos primários principais do metabolismo celular das microalgas, por tanto, sua produção esta relacionada diretamente com o aumento na densidade celular, razão pelo qual a análise estatística tanto para a produção de clorofila A quanto para a concentração de biomassa são similares (Lourenço, 2006). A clorofila C é um pigmento intermediário na transferência de energia entre a clorofila A e os carotenóides, e sua conversão de Clorofila C/Carótenoides foi mantida em 0.4 nas condições estudadas. Ou seja, que nestas circunstâncias não foi favorecido a conversão de clorofila C a carotenóides.

Tabela 12 Pigmentos fotossintéticos para diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade.

	Pigmentos fotossintéticos (µg/mL)		
I.L, Sal	Clorofila A	Clorofila C	Carotenóides
130, 47	3.98 ±0.09	1.14±0.03	2.95±0.08
67, 7	3.35±0.13	1.02±0.05	2.42±0.14
38, 47	1.92±0.10	0.56±0.02	1.43±0.04
130, 55	2.66±0.06	0.85±0.05	2.12±0.05
67, 55	2.55±0.17	0.81±0.05	1.97±0.10
38, 55	1.42±0.17	0.47±0.05	1.10±0.13
130, 40	3.71±0.26	1.15±0.09	2.90±0.13
67, 40	3.24±0.19	1.05±0.09	2.51±0.18
38, 40	1.80±0.06	0.62±0.06	1.36±0.03

Para ter uma melhor visualização do efeito da salinidade e da intensidade de luz nas células de *Isochrysis galbana*, se fez uma relação da produção de pigmentos pela densidade celular para cada condição testada, as quais foram apresentadas nas figuras 28, 29 e 30. Nestes gráficos se pode observar claramente a correlação negativa entre a intensidade luminosa e produção de pigmentos por célula, também se pode observar que a variação na salinidade não foi um parâmetro significativo para a mudança na geração de clorofilas e carotenóides.

O aumento de concentração de clorofilas por célula a menores intensidades de luz se deve á ajuste cromático feito pelas microalgas para poder executar a fotossíntese quando se esta em presença de baixas intensidades luminosas (Campos & Barbarino, 2010).

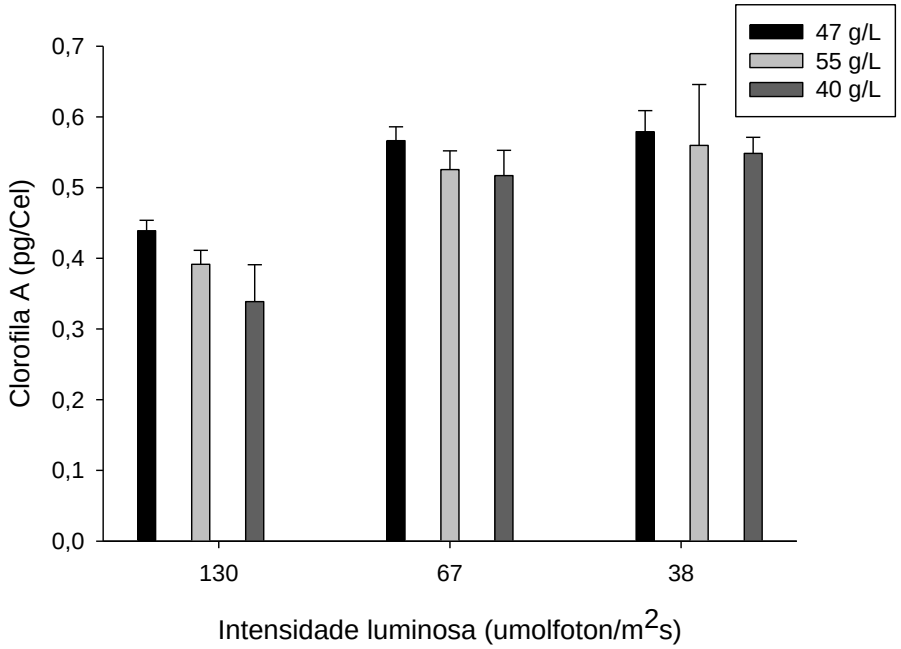


Figura 28 Produção de Clorofila A sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade

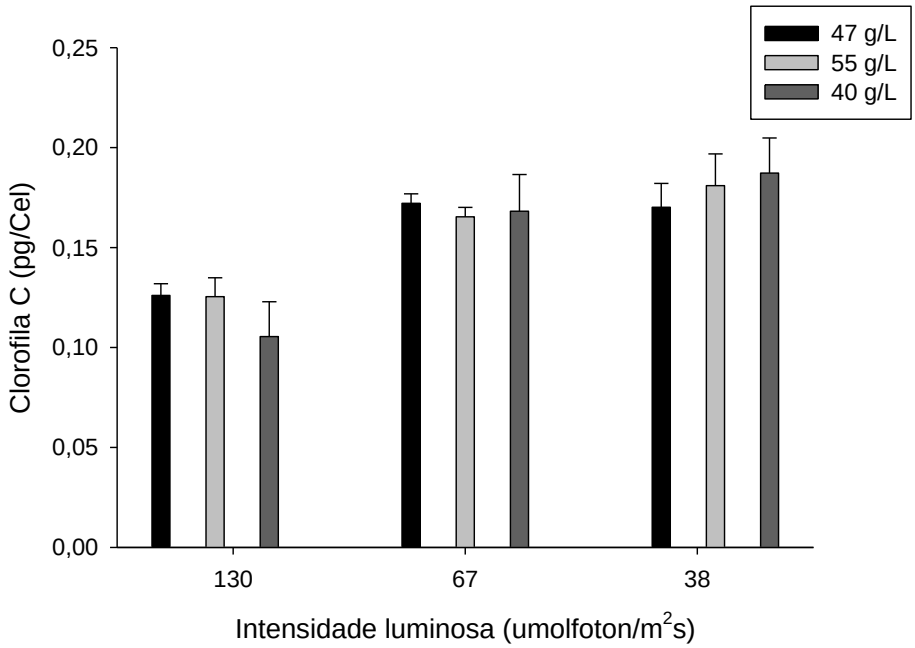


Figura 29 Produção de Clorofila C sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade

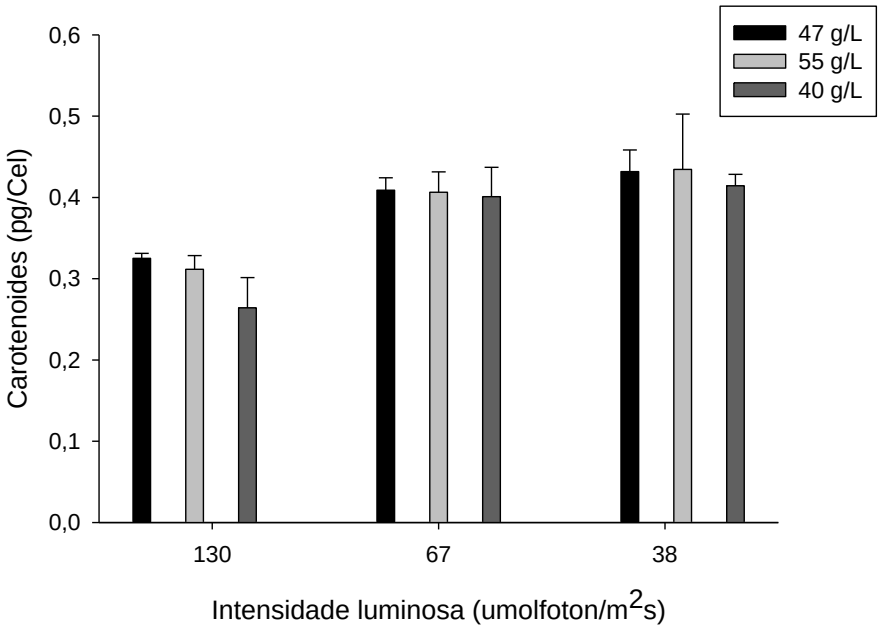


Figura 30 Produção de Carotenóides sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade

5.2.5 Interposição de superfícies de respostas

Finalmente foi feita a otimização das condições de cultivo na segunda etapa utilizando a função *Desirability*. Para a otimização, novamente foram consideradas as respostas de crescimento e porcentagem de lipídios com um valor desejável de 0.8, e as respostas de acumulação de DHA e poli-insaturados tipo ômega 3 com um valor desejável de 1. As respostas de carboidratos e pigmentos não foram apreciadas já que não estimulam a produção de DHA ou das PUFAs tipo ômega 3. Porém, a sua determinação é importante porque com esses dados é possível pensar em um aproveitamento integral da microalga.

A Figura 31 apresenta o gráfico de interposição de respostas e curva de nível. Pode-se observar que a variação que gera um aumento simultâneo positivo em todas as respostas é o aumento da intensidade luminosa até a saturação. Já a variação da salinidade em altas concentrações não gera uma mudança importante nas respostas estudadas.

Conforme exposto na Figura 32, a otimização gerada pela função *Desirability* satisfez em um 71 % os valores desejados. A melhor combinação de parâmetros é utilizar uma salinidade de 47.5 g/L e uma intensidade luminosa de 130 μmol fotons/m^2s, para alcançar uma concentração de biomassa de 231.74 mg/L, uma acumulação de lipídios de 27.28 %, e uma porcentagem de DHA e poli-insaturados de tipo ômega 3 de 12.5 % e 41.6 % respetivamente.

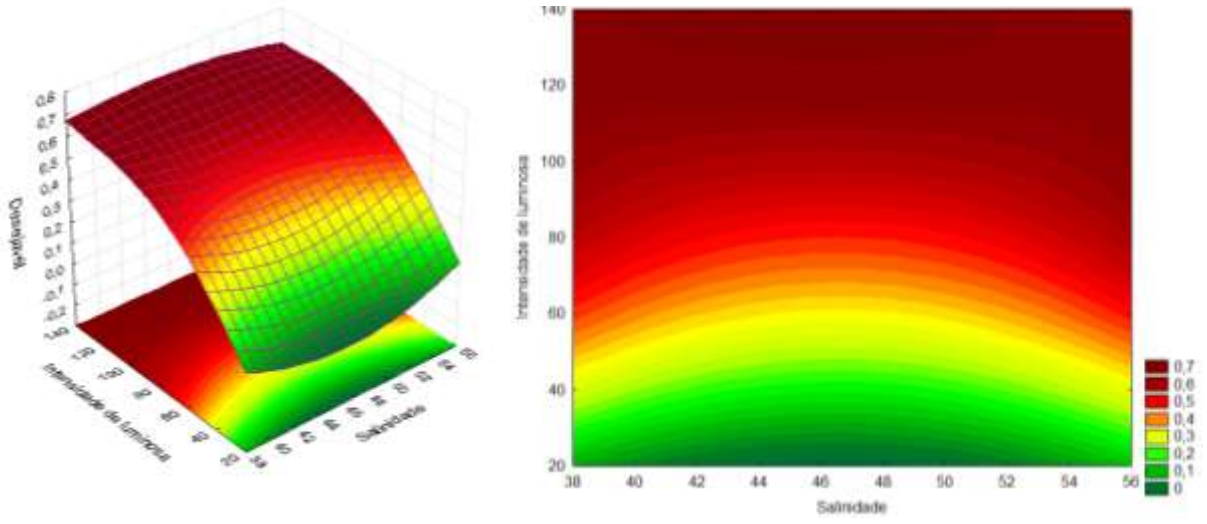


Figura 31 Superfície de resposta e curva de nível da função *Desirability* para a otimização simultânea de % DHA, poli-insaturados tipo ômega 3, lipídios totais e respostas de crescimento sob diferentes condições de intensidade luminosa e salinidade

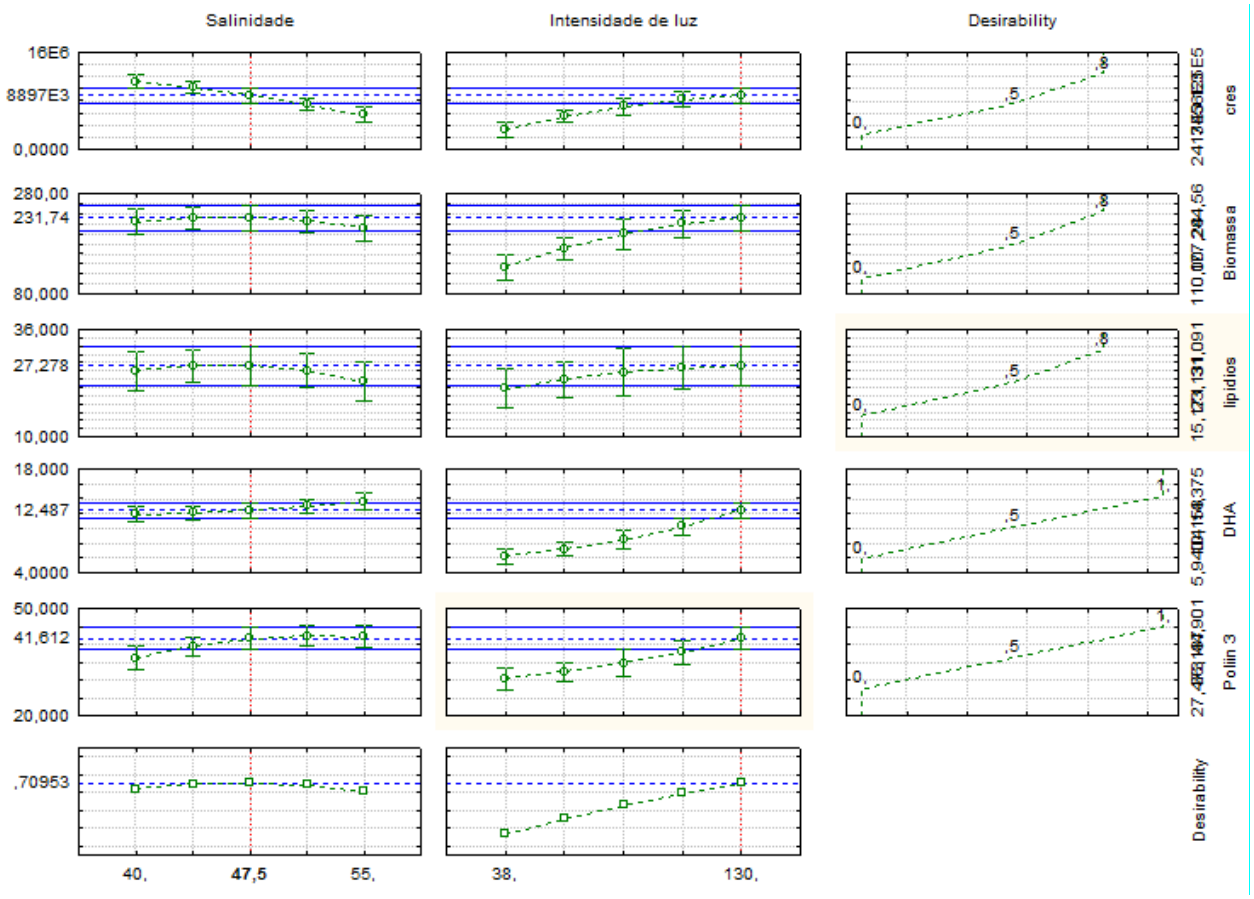


Figura 32 Função otimização *Desirability* para predizer a melhor combinação de parâmetros de cultivo

Devido a que os resultados da otimização estão próximos a um ponto avaliado, foi corroborado a aderência entre os resultados experimentais e preditos pelo software, como pode ser visto nas figuras e tabelas apresentadas no presente capitulo.

Para finalizar, ao comparar o resultado desta otimização com a otimização resultante da primeira fase, pode-se concluir que sob condições de cultivo de alta aeração e salinidade, e intensidades luminosas de 115 - 130 μmol fotons/m^2s, são conseguidos os melhores resultados de produção de biomassa, acumulação de lipídios, DHA e ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3.

6 CONCLUSÕES

As conclusões feitas com base aos resultados e análises estatísticas obtidas do cultivo fotoautotrófico de *Isochrysis galbana*, sob diferentes condições de intensidade luminosa, salinidade, aeração e idade do cultivo, são as seguintes:

- Apesar do aumento na vazão de ar, de 0.5 até 2.5 vvm, ter influenciado positivamente o crescimento de *Isochrysis galbana*, a concentração máxima de biomassa (326 mg/L) e densidade celular (1.69* 10^7 cel/mL) obtidas aos dez dias de cultivo, com salinidade de 28 g/L e intensidade luminosa de 130 μmol fotons/m^2s, foram limitadas pela baixa disponibilidade de CO_2 presente no ar. Porém, um aumento superior a 2.5 vvm na vazão de ar gerou danos nas células. Devido a isso, a injeção de ar enriquecido com CO_2 é indispensável para suprir adequadamente a demanda desta fonte de carbono.

- Na avaliação da etapa do cultivo, concluiu-se que a coleta da biomassa da microalga na etapa final de crescimento, aos 6 dias de cultivo, permite um aumento na produtividade de biomassa de 1.4 vezes comparada com a obtida na etapa estacionária, conseguindo uma máxima produtividade de 40.37 mg/ld. Além disso, esta biomassa possui um perfil de ácidos graxos com maior porcentagem de ALA (precursor dos ômega 3) e com quantidades similares de lipídios (23 %), DHA (9.23 %), poli-insaturados do tipo ômega 3 e pigmentos fotossintéticos que a biomassa coletada aos 10 dias de cultivo.

- A interação inversa entre os fatores de intensidade luminosa-aeração e acréscimo na intensidade luminosa no primeiro planejamento, provocaram um aumento positivo na acumulação de lipídios, alcançando um valor máximo de 26.8 % de lipídios totais.

- Os tratamentos com intensidades luminosas entre 115 até 315 μmol fotons/m^2s, vazões de ar entre 0.5 até 2.5 vvm e salinidade entre 28 até 38 g/L, não provocaram um aumento significativo na acumulação de DHA e de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3, como era esperado. No entanto, o parâmetro que esteve próximo a ser significativo foi o incremento na salinidade até a concentração de 38 g/L, alcançando

porcentagens de DHA e poli-insaturados do tipo ômega 3 de 13.26 e 41.79 %, respectivamente.

- O aumento da intensidade luminosa de 38 μmol fotons/m^2s até chegar a saturação de luz próxima a 115 μmol fotons/m^2s foi indispensável para o bom crescimento da microalga e para o acréscimo na produção de lipídios, acumulação de DHA e ácidos graxos poli-insaturados tipo ômega 3. Condições de concentração de salinidade acima de 40 g/L e a interação com a intensidade luminosa, não afetaram estas respostas bioquímicas.

- O uso de modelos matemáticos como a função de otimização Desirability, que permite a superposição de varias superfícies de resposta, é de grande ajuda, já que possibilita uma melhor organização da informação obtida e facilita as analises do trabalho, ajudando a determinar as condições ótimas de cultivo.

- A conclusão mais importante deste trabalho é que o cultivo de *Isochrysis galbana* sob uma intensidade luminosa entre 115 - 130 μmol fotons/m^2s, salinidade de 47 g/L, vazão de ar de 2.5 vvm e coletada na etapa final de crescimento, são as condições adequadas para levar ao aumento nos ácidos graxos poli-insaturados totais até 46 %, constituídos maioritariamente por ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3 (41.6 % dos ácidos graxos totais) e uma porcentagem de DHA de 12.5 %, sem afetar de forma considerável a produção de biomassa (231 mg/L) e a porcentagem de lipídios totais (27.28 %).

- A relação de PUFAs ômega 3/ômega 6, sob as diferentes condições de cultivo testadas, varia entre 4 e 7. Por conseguinte, conclui-se que a biomassa da microalga *Isochrysis galabana* apresenta um grande potencial como matéria-prima para sua aplicação, tanto em suplementos alimentícios enriquecidos com ômega 3, quanto na aquicultura.

- Finalmente, a ampla taxa de tolerância de *Isochrysis galbana* a concentrações de salinidade entre 28 – 55 g/l permite pensar que a microalga possui potencial para ser cultivada em tanques abertos, sem a preocupação de um controle rígido neste parâmetro e esperando baixas contaminações por outros tipos de microrganismos.

7 TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o efeito do ar enriquecido com diferentes porcentagem de CO_2 na produção de biomassa, no perfil de ácidos graxos, lipídios e outras respostas bioquímicas da microalga *Isochrysis galbana*.

- Avaliar o emprego de nutrientes econômicos provenientes de materiais residuais da indústria, no cultivo fotoautotofico de *Isochrysis galbana* a fim de avaliar a produção de lipídios, produção de ácidos graxos poli-instaurados e reduzir os custos de produção na etapa de cultivo.

- Com a finalidade de aproveitar integralmente os lipídios, e devido a que a microalga estudada tem uma porcentagem aproximada de 60 % entre SAFAs e MUFAs, e 40 % de PUFAs, procurar um método de separação econômico que permita o isolamento das PUFAs para serem aproveitadas em aplicações na indústria de alimentos. Igualmente, as SAFAs e MUFAs podem ser utilizadas para aplicações em biocombustíveis.

8 BIBLIOGRAFIA

Abyor, N., Ariyanti, D., & Hadiyanto, H. (2011). Potential Production of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae. *Internal.J.of Sci. and Eng.*, *2*(1), 13–16.

Adarme-vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories : a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 1–10. doi:10.1186/1475-2859-11-96

Adarme-vega, T. C., Thomas-hall, S. R., & Schenk, P. M. (2013). Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 14–18. doi:10.1016/j.copbio.2013.08.003

Amaro, H. M., Macedo, Â. C., & Malcata, F. X. (2012). Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? *Energy*, *44*(1), 158–166. doi:10.1016/j.energy.2012.05.006

An, M., Mou, S., Zhang, X., Ye, N., Zheng, Z., Cao, S., … Miao, J. (2013). Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga Chlamydomonas sp. ICE-L. *Bioresource Technology*, *134*, 151–7. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.142

Atalah, E., Cruz, C. M. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., & Caballero, M. J. (2007). Two microalgae Crypthecodinium cohnii and Phaeodactylum tricornutum as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (Sparus aurata), *270*, 178–185. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.009

Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., Zamir, A., … Israel, M. A. (2002). Salt Induction of Fatty Acid Elongase and Membrane Lipid Modifications in the Extreme Halotolerant Alga Dunaliella salina. *Plantphysiol*, *129*, 1320–1329. doi:10.1104/pp.001909.1320

Bergé, J., & Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms : molecular biodiversity , roles as biomarkers , biologically active compounds , and economical aspects. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, *96*, 49–125.

Berger, R., Liaaen-jensen, S., Mcalister, V., & Guillard, R. R. L. (1977). Carotenoids of Prymnesiophyceae (Haptophyceae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *5*(3884), 71–75.

Bianchini, R. (2006). *Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas Chaetoceros muelleri e Thalassiosira fluviatilis , com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados*. Universidade Federal de Santa Catarina.

Bianchini, R., Silvana, D., Maurício, O., & Bibliográfica, R. (2006). Microalgas , produtos e aplicações. *Ciencia Rural*, 1959–1967.

Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917.

Brown, M., Dunstan, G., Jeffrey, S. ., Volkman, J., Barret, S., & LeRoi, M. (1993). The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte Isochrysis sp.(clone T-ISO). *Journal of Phycology*, *29*, 601–612.

Campos, V. B., & Barbarino, E. (2010). Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciencia Rural*, *40*, 339–347.

Cao, Y., Cao, Y., & Zhao, M. (2012). Biotechnological production of eicosapentaenoic acid: From a metabolic engineering point of view. *Process Biochemistry*, *47*(9), 1320–1326. doi:10.1016/j.procbio.2012.05.011

Carvalho, A. P., & Malcata, F. X. (2005). Optimization of ω-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO2 and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology*, *7*(4), 381–388. doi:10.1007/s10126-004-4047-4

Chauton, M. S., Reitan, K. I., Norsker, N. H., Tveterås, R., & Kleivdal, H. T. (2015). A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture*, *436*, 95–103. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.10.038

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*(3), 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Citadin, C. (2007). *Clonagem e caracterização do gene da enzima Δ 6- dessaturase de ácido graxo e análise de parte do genoma funcional de Thalassiosira fluviatilis*. Universidade de Brasília.

Conchillo, A., Valencia, I., & Puente, A. (2012). Componentes Funcionales en Aceites de Pescado y de Alga. *Mundo Alimentario*, 5–10.

Coutinho, C., Mendon, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from Isochrysis galbana. *Science of Food and Agriculture*, *896*(88), 891–896. doi:10.1002/jsfa

De Jesus Raposo, M. F., de Morais, R. M. S. C., & de Morais, A. M. M. B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, *93*(15), 479–86. doi:10.1016/j.lfs.2013.08.002

Dubois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. doi:10.1021/ac60111a017

Eismann, A. I. (2014). *Respostas bioquímicas e morfológicas de Isochrysis galbana em cultivo electroestimulado e enriquecido em CO2*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Facts, P. (2012). *Global Market for EPA / DHA Omega-3 Products* (pp. 1–53). Rockville, Maryland.

Gladyshev, M. I., Semenchenko, V. P., Dubovskaya, O. P., Fefilova, E. B., Makhutova, O. N., Buseva, Z. F., … Kononova, O. N. (2011). Effect of temperature on contents of essential highly unsaturated fatty acids in freshwater zooplankton. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, *41*(4), 339–347. doi:10.1016/j.limno.2011.03.001

Gong, Y., Wan, X., Jiang, M., Hu, C., Hu, H., & Huang, F. (2014). Metabolic engineering of microorganisms to produce omega-3 very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research*, *56*, 19–35.

González, M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS*, *59*, 64–70.

Grima, E. M., Srinchez, J. A. P., Siinchez, J. L. G., Camachoa, F. G., & Alonsob, D. L. (1992). EPA from Isochrysis galana Growth Conditions and Productivity. *Process Biochemistry*, *27*, 299–305.

Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., & Tremblin, G. (2009). Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga Pavlova lutheri commonly used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *369*(2), 136–143. doi:10.1016/j.jembe.2008.11.009

Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W. L. Smith & M. H. Chanley (Eds.), *Culture of marine invertebrate* (pp. 29–60). New York: Springer US.

Gupta, A., Barrow, C. J., & Puri, M. (2012). Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1733–1745. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.014

Guschina, I. a., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, *45*(2), 160–186. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001

Hakalin, N. (2014). *Otimização das condições de cultivo da microalga Scenedesmus sp. para a produção de biodiesel*. Universidade de Brasilia.

Hakvag, C. H. (2012). *The Effect of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Cancer Cells*. Norwegian University of Science and Technology.

Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. a, & Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of Phaeodactylum tricornutum for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, *22C*, 3–9. doi:10.1016/j.ymben.2013.12.003

Harwood, J. L., & Guschina, I. a. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, *91*(6), 679–84. doi:10.1016/j.biochi.2008.11.004

He, Q., Yang, H., Wu, L., & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, *191*, 219–28. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.021

Ho, S.-H., Chen, C.-Y., & Chang, J.-S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N. *Bioresource Technology*, *113*(January 2016), 244–252. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133

Howard, R. L., Abotsi, E., L, J. V. R. E., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology : issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, *2*(December), 602–619.

Huerlimann, R., Steinig, E. J., Loxton, H., Zenger, K. R., Jerry, D. R., & Heimann, K. (2014a). Effects of growth phase and nitrogen starvation on expression of fatty acid desaturases and fatty acid composition of Isochrysis aff. galbana (TISO). *Gene*, *545*(1), 36–44. doi:10.1016/j.gene.2014.05.009

Huerlimann, R., Steinig, E. J., Loxton, H., Zenger, K. R., Jerry, D. R., & Heimann, K. (2014b). The effect of nitrogen limitation on acetyl-CoA carboxylase expression and fatty acid content in Chromera velia and Isochrysis aff. galbana (TISO). *Gene*, *543*(2), 204–11. doi:10.1016/j.gene.2014.04.022

Jeffrey, S., & Humphrey, G. . (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol*, *167*, 191–194.

Jham, G. N., & Campos, L. G. (1982). Use of Aqueous HCI / MeOH as Esterification Reagent for Analysis of Fatty Acids Derived from Soybean Lipids. *JAOCS*, *59*(3), 132–133.

Jiang, H., & Gao, K. (2004). Effects of Lowering Temperature During Culture on the Production of Polyunsaturated Fatty Acids in the Marine Diatom Phaeodactylum Tricornutum (Bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology*, *40*(4), 651–654. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03112.x

Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. *Biochimie*, *93*(1), 91–100. doi:10.1016/j.biochi.2010.07.020

Lemahieu, C., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., Buyse, J., & Foubert, I. (2013). Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. *Food Chemistry*, *141*(4), 4051–4059. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.078

Li, M., Ou, X., Yang, X., Guo, D., Qian, X., Xing, L., & Li, M. (2011). Isolation of a novel C18-Δ9 polyunsaturated fatty acid specific elongase gene from DHA-producing Isochrysis galbana H29 and its use for the reconstitution of the alternative Δ8 pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology Letters*, *33*(9), 1823–1830. doi:10.1007/s10529-011-0626-4

Lin, Y.-H., Chang, F.-L., Tsao, C.-Y., & Leu, J.-Y. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of Isochrysis galbana CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal*, *37*(2), 166–176. doi:10.1016/j.bej.2007.04.014

Liu, C., & Lin, L. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of Isochrysis sp . *Bot.Bull.Acad.Sin.*, *42*, 207–214.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Darnell, J., Kaiser, C., … Scott, M. (2003). *Molecular cell Biology* (fifth., p. 1052). New York.

Los, D. a, & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1666*(1-2), 142–57. doi:10.1016/j.bbamem.2004.08.002

Lourenço, S. O. (2006). *Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações*. (RIMA, Ed.) (p. 588). São Paulo.

Madigan, M., Martinko, J., & Brock, P. (2004). *Biología de los microorganismos*. (Pearson Alhambra, Ed.) (10th ed., pp. 398–403).

Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., … Cadoret, J. P. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of Isochrysis affinis galbana relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, *326-329*, 106–115. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.11.020

Martins, M. B., Piotto, R. F., & Barbosa, M. (2008). Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça Properties of Omega-3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. *Inst Ciência Saúde*, *26*(2), 153–156.

Mesquita, C. (2013). *Aplicação de tecnologia enzimática para a obtenção de hidrolisados protéicos de microalgas*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *10*(1), 31–41. doi:10.1007/s11157-010-9214-7

Myklestad, S., & Haug, A. (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Biol.Ecol*, *9*(1969), 125–136.

Nwokoagbara, E., Olaleye, A. K., & Wang, M. (2015). Biodiesel from microalgae: The use of multi-criteria decision analysis for strain selection. *Fuel*, *159*, 241–249. doi:10.1016/j.fuel.2015.06.074

Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by Nannochloropsis sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(4), 1429–41. doi:10.1007/s00253-011-3170-1

Pereira, C., Hobuss, C., Villela, J., Ferreira, L., Del pino, F., & Mesko, M. (2013). Biodiesel renovável derivado de microalgas: Avanços e perspectivas tecnológicas. *Quimica Nova*, *35*(10), 2013–2018.

Picardo, M. C., Luiz, J., Medeiros, D., Queiroz, O. De, Araújo, F., & Moreira, R. (2013). Effects of CO 2 enrichment and nutrients supply intermittency on batch cultures of Isochrysis galbana. *Bioresource Technology*, *143*, 242–250. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.113

Pragya, N., Pandey, K. K., & Sahoo, P. K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *24*, 159–171. doi:10.1016/j.rser.2013.03.034

Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*(3), 287–293. doi:10.1007/s002530100702

Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 635–648. doi:10.1007/s00253-004-1647-x

Ratha, S. K., & Prasanna, R. (2012). Bioprospecting microalgae as potential sources of "Green Energy"—challenges and perspectives (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *48*(2), 109–125. doi:10.1134/S000368381202010X

Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, *103*, 444–467. doi:10.1016/j.apenergy.2012.10.004

Richmond, a, & Cheng-Wu, Z. (2001). Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of Nannochloropsis sp. outdoors. *Journal of Biotechnology*, *85*(3), 259–269. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173093

Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, *46*(1), 115–126. doi:10.1007/s11099-008-0019-7

Roopnarain, a, Gray, V. M., & Sym, S. D. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in Isochrysis galbana U4 for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *156*, 408–11. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.092

Rosenberg, J. N., Oyler, G. a, Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(5), 430–6. doi:10.1016/j.copbio.2008.07.008

Roy, S. Sen, & Pal, R. (2014). Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, *68*(1), 1–8. doi:10.1007/s12595-013-0089-9

Rubio-Rodríguez, N. (2011). *Supercritical fluid technology for extraction, concentration and formulation of omega 3 rich oils*.

Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M., Sanz, M. T., & Carballido, J. R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*(1), 1–12. doi:10.1016/j.ifset.2009.10.006

Sahu, A., Pancha, I., Jain, D., Paliwal, C., Ghosh, T., Patidar, S., … Mishra, S. (2013). Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry*, *89*, 53–58. doi:10.1016/j.phytochem.2013.02.001

Sandoval, I. (2015). *Avaliação da produtividade de biomassa e do conteúdo de óleo da microalga Desmodesmus sp. em diferentes condições de cultivo para aplicações industriais*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Sen, B., & Koçer, M. (2005). Studies on grown of marine microalgae in batch cultures: Isochrysis galbana (Haptophyta). *Asian Journal of Plant Sciences*, 639–641.

Sibi, G., Shetty, V., & Mokashi, K. (2015). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. *Journal of the Energy Institute*, 1–5. doi:10.1016/j.joei.2015.03.008

Sieburth, J., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure : Heterotrophic. *Limnology and Oceanography*, *23*(6), 1256–1263.

Souza, N., Matsushita, M., & Visentainer, J. (1998). ACIDOS GRAXOS : Estrutura, classificação, nutrição e saúde. *Arquivos Da Apadec*, *2*(2), 102–107.

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1968). *A practical handbook of seawater analysis.* (p. 311). Otawa,Ontario, Canadá: Fisheries Research Board of Canada.

Talab, H. A., Ardjmand, M., Motallebi, A., & Pourgholam, R. (2010). Extraction and purification of omega-3 fatty acids concentrate from Hypophthalmichthys molitrix oil. *Nutrition & Food Science*, *40*(2), 193–203. doi:10.1108/00346651011029228

Tang, S., Qin, C., Wang, H., Li, S., & Tian, S. (2011). Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, *57*(1), 44–49. doi:10.1016/j.supflu.2011.01.010

Theresia, U., Thomas, W., & Klaus D, V. (2012). Bioresource Technology Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, *121*, 54–60. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.098

Tomaselli, L., Masojídek, J., Lee, Y. ., Vonshak, A., & Molina, E. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. (A. Richmond, Ed.) (Blackwell., Vol. 1, pp. 1–577).

Tzovenis, I., De Pauw, N., & Sorgeloos, P. (2003). Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of diferent light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture*, *216*, 223–242.

Tzovenis, I., Pauw, N. De, & Sorgeloos, P. (1997). Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of Isochrysis aff . galbana (clone T-ISO). *Aquaculture International*, *507*, 489–507.

Van Bergeijk, S. a., Salas-Leiton, E., & Cañavate, J. P. (2010). Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte Isochrysis aff. galbana (T-iso) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, *43*(1), 14–23. doi:10.1016/j.aquaeng.2010.03.001

Vazhappilly, R., & Chen, F. (1998). Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth. *JAOCS*, 393–397.

Viegas, C. V., Hachemi, I., Mäki-Arvela, P., Smeds, A., Aho, A., Freitas, S. P., … Murzin, D. Y. (2015). Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga Chlorella sp. *Algal Research*, *11*, 156–164. doi:10.1016/j.algal.2015.06.014

Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, *40*(12), 3627–3652. doi:10.1016/j.procbio.2005.02.020

Webb, K. L., & Chu, L. E. (1983). Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In G. D. Pruder, C. J. Langdon, & D. E. Conklin (Eds.), *2nd Int. Conference on Aquaculture Nutrition* (pp. 272–291). Baton Rouge, LA.

Wen, Z.-Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, *21*(4), 273–294. doi:10.1016/S0734-9750(03)00051-X

Xu, Y., & Boeing, W. J. (2014). Modeling maximum lipid productivity of microalgae: Review and next step. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *32*, 29–39. doi:10.1016/j.rser.2014.01.002

Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic , mixotrophic and cyclic light-autotrophic / dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *6*, 87–102.

Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated Dunaliella salina strain. *PloS One*, *9*(3), e91957. doi:10.1371/journal.pone.0091957

Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H., & Morinaga, T. (2012). Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of Isochrysis galbana. *Aquaculture*, *338-341*, 111–117. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.01.005

Zhao, P., Yu, X., Li, J., Tang, X., & Huang, Z. (2014). Enhancing lipid productivity by co-cultivation of Chlorella sp. U4341 and Monoraphidium sp. FXY-10. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *118*(1), 72–77. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.014

ANEXO 1

CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Reagentes

- Solução fenol 5 %
- Ácido sulfúrico concentrado 96%
- Stock de glicose 400 µg/mL

Solução stock

- Pesar-se 40 mg de glicose anidrido grado analítico, dissolver e ajustar a 100 mL com água deionizada.
- Rotular a solução adequadamente e manter refrigerada

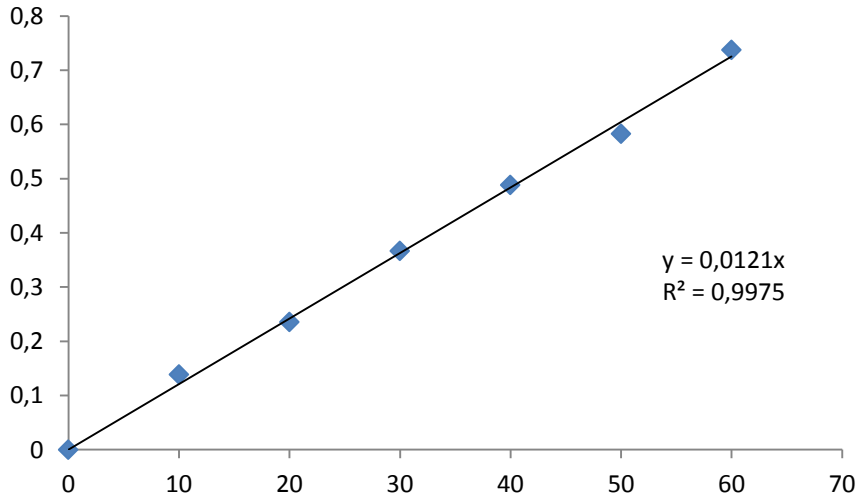
Preparação da curva de calibração

As amostras foram diluídas em tubos de ensaio lisos compridos de acordo ao apresentado na tabela.

Dilução	1	2	3	4	5	6	7
µL Stock glicose	0	25	50	75	100	125	150
µL de água destilada	1000	975	950	925	900	875	850
[ ] de glicose (mg/L)	0	10	20	30	40	50	60

Depois da diluição, adicionar-se 0.5 mL de fenol 5% em cada tubo de ensaio, seguido de uma agitação no vortex por 30 seg. Logo 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado são adicionados, realizando-se novamente uma agitação vigorosa por 30 seg. A mistura se deixa repousar por 30 min para finalmente fazer a determinação espectrofotométrica num comprimento de onda de 485 nm.

OBS- O procedimento deve ser feito na capela de exaustão de gases e o ácido sulfúrico deve ser adicionado diretamente as amostras para que a reação seja completa e não se cometa erros na leitura.



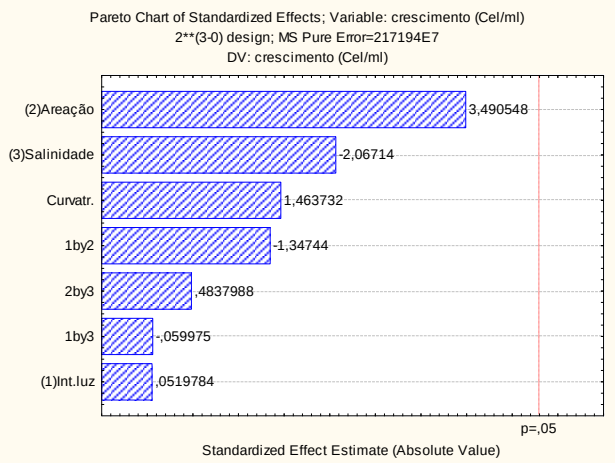
Anexo 1 Curva de calibração Glicose

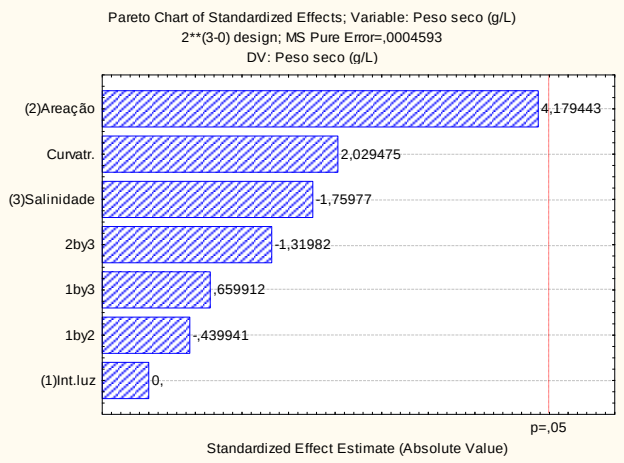
ANEXO 2

ANALISE ESTATISTICA

PRIMEIRA ETAPA

- **Crescimento**





ANOVA; Var: crescimento (Cel/ml); R-sqr=,90992; Adj.,6
2**(3-0) design; MS Pure Error=217194E7
DV: crescimento (Cel/ml)

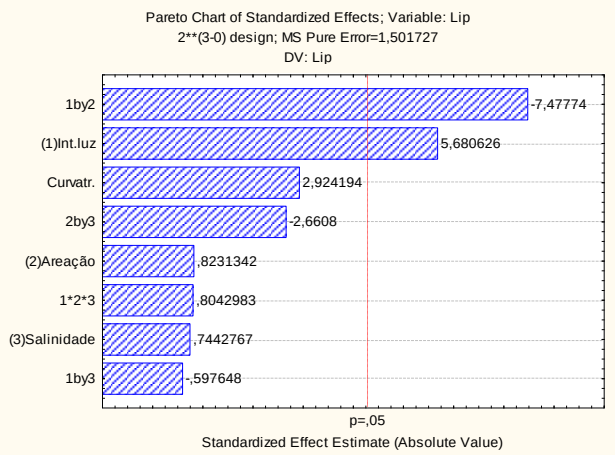
Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	4,653419E+12	1	4,653419E+12	2,14251	0,280833
(1)Int.luz	5,868056E+09	1	5,868056E+09	0,00270	0,963271
(2)Areação	2,646281E+13	1	2,646281E+13	12,18393	0,073180
(3)Salinidade	9,280868E+12	1	9,280868E+12	4,27307	0,174666
1 by 2	3,943368E+12	1	3,943368E+12	1,81559	0,310192
1 by 3	7,812500E+09	1	7,812500E+09	0,00360	0,957629
2 by 3	5,083681E+11	1	5,083681E+11	0,23406	0,676319
Lack of Fit	9,753472E+10	1	9,753472E+10	0,04491	0,851810
Pure Error	4,343889E+12	2	2,171944E+12		
Total SS	4,930394E+13	10			

ANOVA; Var: Peso seco (g/L); R-sqr=,89394;
2**(3-0) design; MS Pure Error=,0004593
DV: Peso seco (g/L)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0,001892	1	0,001892	4,11877	0,179551
(1)Int.luz	0,000000	1	0,000000	0,00000	1,000000
(2)Areação	0,008022	1	0,008022	17,46774	0,052759
(3)Salinidade	0,001422	1	0,001422	3,09677	0,220516
1 by 2	0,000089	1	0,000089	0,19355	0,702956
1 by 3	0,000200	1	0,000200	0,43548	0,577143
2 by 3	0,000800	1	0,000800	1,74194	0,317712
Lack of Fit	0,000556	1	0,000556	1,20968	0,386091
Pure Error	0,000919	2	0,000459		
Total SS	0,013899	10			

Anexo 2 1 Diagrama de Pareto e ANOVA de crescimento em Cel/ml e concentração de biomassa em base seca (g/L) no 10 dia de cultivo.

- **Lipídios**



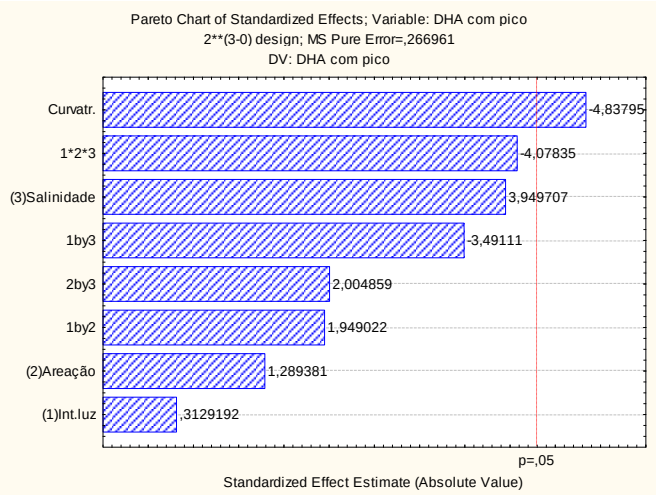
Effect Estimates; Var.:Lip; R-sqr=,98149; Adj.,90745
2**(3-0) design; MS Pure Error=1,501727
DV: Lip

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	28,58512	0,433262	47,51196	0,000443	18,7209
Curvatr.	4,85202	1,659267	2,92419	0,099764	-2,2872
(1)Int.luz	4,92240	0,866524	5,68063	0,029619	1,1940
(2)Areação	0,71327	0,866524	0,82313	0,496961	-3,0151
(3)Salinidade	0,64493	0,866524	0,74428	0,534276	-3,0834
1 by 2	-6,47964	0,866524	-7,47774	0,017418	-10,2080
1 by 3	-0,51788	0,866524	-0,59765	0,610732	-4,2462
2 by 3	-2,30564	0,866524	-2,66080	0,116976	-6,0340
1*2*3	0,69694	0,866524	0,80430	0,505634	-3,0314

Anexo 2 2Diagrama de Pareto e ANOVA de lipídios totais (%) no 6 dia de cultivo.

- **Perfil de ácidos graxos**

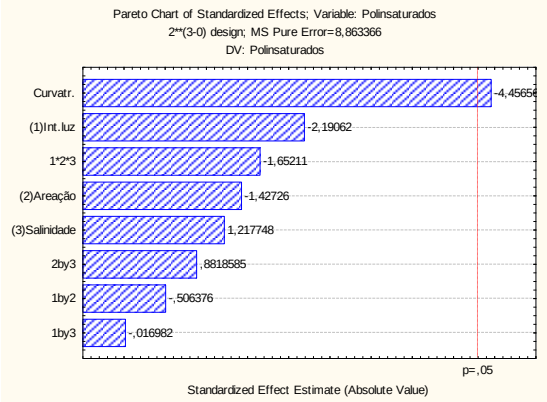
DHA C22:6



Effect Estimates; Var.:DHA com pico; R-sqr=,97481; Adj.,8740
2**(3-0) design; MS Pure Error=,266961
DV: DHA com pico

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	10,92516	0,182675	59,80658	0,000279	10,13918	11,71115
Curvatr.	-3,38459	0,699692	-4,83795	0,040168	-6,39469	-0,37449
(1)Int.luz	0,11433	0,366350	0,31292	0,783958	-1,45765	1,68630
(2)Areação	0,47107	0,366350	1,28938	0,326260	-1,10090	2,04306
(3)Salinidade	1,44303	0,366350	3,94971	0,058530	-0,12895	3,01500
1 by 2	0,71207	0,366350	1,94902	0,190621	-0,85990	2,28405
1 by 3	-1,27547	0,366350	-3,49111	0,073159	-2,84745	0,29650
2 by 3	0,73248	0,366350	2,00486	0,182844	-0,83950	2,30445
1*2*3	-1,49003	0,366350	-4,07835	0,055191	-3,06200	0,08196

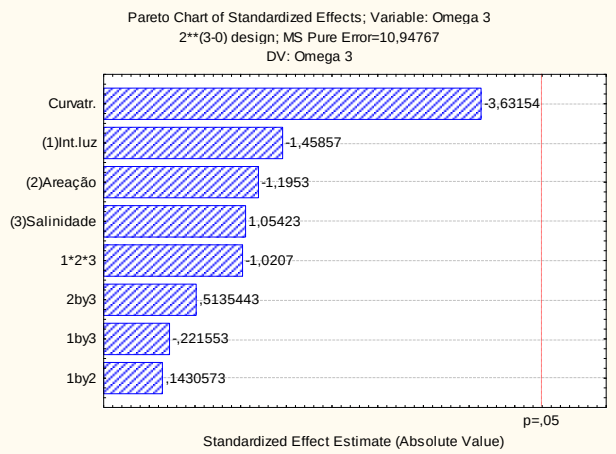
Ácidos graxos poliinsaturados



Effect Estimates; Var.:Polinsaturados; R-sqr=,94108; A
2**(3-0) design; MS Pure Error=8,863366
DV: Polinsaturados

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	Cn
Mean/Interc.	42,85888	1,052578	40,71797	0,000603	38,3300	47
Curvatr.	-17,9647	4,031067	-4,45656	0,046841	-35,3090	-0
(1)Int.luz	-4,6116	2,105156	-2,19062	0,159862	-13,6694	4
(2)Areação	-3,0046	2,105156	-1,42726	0,289655	-12,0624	6
(3)Salinidade	2,5636	2,105156	1,21775	0,347491	-6,4942	11
1 by 2	-1,0660	2,105156	-0,50638	0,662897	-10,1238	7
1 by 3	-0,0357	2,105156	-0,01698	0,987993	-9,0935	9
2 by 3	1,8565	2,105156	0,88186	0,470875	-7,2013	10
1*2*3	-3,4780	2,105156	-1,65211	0,240316	-12,5357	5

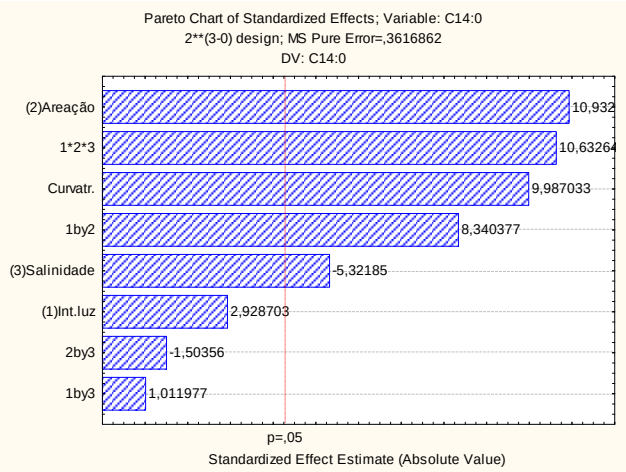
Ácidos graxos poliinsaturados ômega 3



Effect Estimates; Var.:Omega 3; R-sqr=,9058; Adj
2**(3-0) design; MS Pure Error=10,94767
DV: Omega 3

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	38,3684	1,169811	32,79877	0,000928	33,335
Curvatr.	-16,2694	4,480036	-3,63154	0,068164	-35,545
(1)Int.luz	-3,4125	2,339623	-1,45857	0,282061	-13,479
(2)Areação	-2,7966	2,339623	-1,19530	0,354480	-12,863
(3)Salinidade	2,4665	2,339623	1,05423	0,402336	-7,600
1 by 2	0,3347	2,339623	0,14306	0,899357	-9,731
1 by 3	-0,5184	2,339623	-0,22155	0,845226	-10,584
2 by 3	1,2015	2,339623	0,51354	0,658677	-8,865
1*2*3	-2,3880	2,339623	-1,02070	0,414765	-12,454

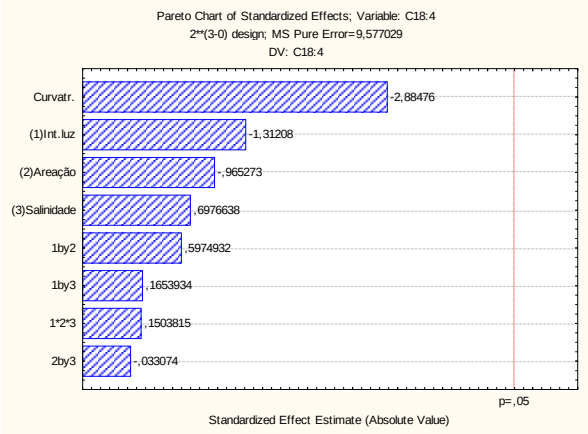
C14:0



Effect Estimates; Var.:C14:0; R-sqr=,9955; Adj.,9774
2**(3-0) design; MS Pure Error=,3616862
DV: C14:0

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	23,13003	0,212628	108,7815	0,000084	22,21516
Curvatr.	8,13248	0,814394	9,9870	0,009878	4,62881
(1)Int.luz	1,24545	0,425257	2,9287	0,099491	-0,58428
(2)Areação	4,64930	0,425257	10,9329	0,008263	2,81957
(3)Salinidade	-2,26315	0,425257	-5,3218	0,033542	-4,09298
1 by 2	3,54680	0,425257	8,3404	0,014073	1,71797
1 by 3	0,43035	0,425257	1,0120	0,418067	-1,39938
2 by 3	-0,63940	0,425257	-1,5036	0,271581	-2,46913
1*2*3	4,52160	0,425257	10,6326	0,008730	2,69187

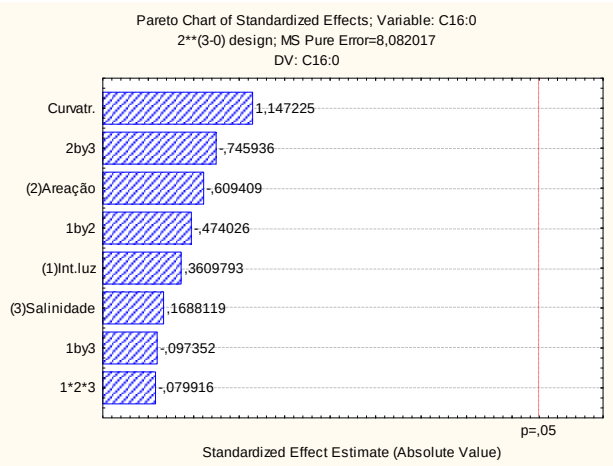
C18:4



Effect Estimates; Var.:C18:4; R-sqr=,8558; Adj.,27901 (23Dat
2**(3-0) design; MS Pure Error=9,577029
DV: C18:4

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limit	+95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	20,7352	1,094134	18,9355	0,002779	16,0082	25,4622
Curvatr.	-12,0877	4,190213	-2,88476	0,102094	-30,1168	5,94129
(1)Int.luz	-2,8712	2,188267	-1,31208	0,319861	-12,2865	6,54418
(2)Areação	-2,1123	2,188267	-0,96527	0,436250	-11,5276	7,30308
(3)Salinidade	1,5267	2,188267	0,69766	0,557583	-7,8887	10,94203
1 by 2	1,3075	2,188267	0,59749	0,610817	-8,1079	10,72283
1 by 3	0,3619	2,188267	0,16539	0,883841	-9,0534	9,77728
2 by 3	-0,0724	2,188267	-0,03307	0,976619	-9,4877	9,34298
1*2*3	0,3291	2,188267	0,15038	0,894260	-9,0863	9,74443

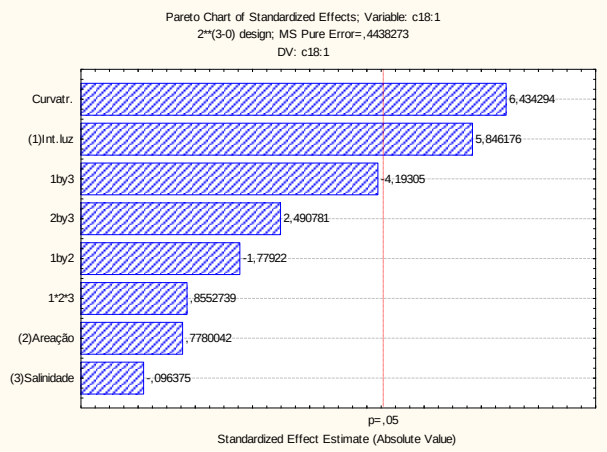
C16:0



Effect Estimates; Var.:C16:0; R-sqr=,56927; A
2**(3-0) design; MS Pure Error=8,082017
DV: C16:0

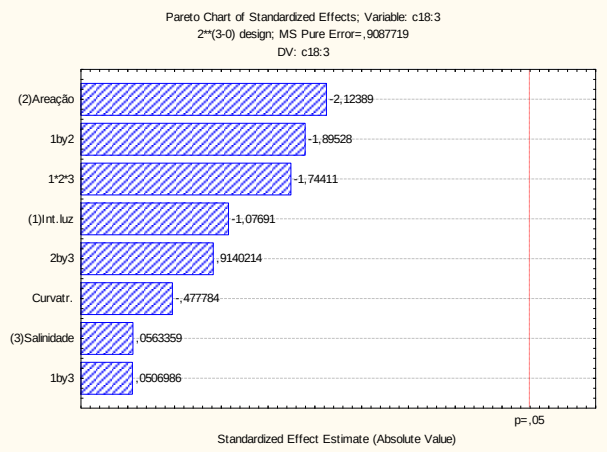
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-9 Cnf
Mean/Interc.	11,19760	1,005113	11,14064	0,007961	6
Curvatr.	4,41600	3,849290	1,14722	0,370011	-12
(1)Int.luz	0,72565	2,010226	0,36098	0,752679	-7
(2)Areação	-1,22505	2,010226	-0,60941	0,604261	-9
(3)Salinidade	0,33935	2,010226	0,16881	0,881473	-8
1 by 2	-0,95290	2,010226	-0,47403	0,682191	-9
1 by 3	-0,19570	2,010226	-0,09735	0,931324	-8
2 by 3	-1,49950	2,010226	-0,74594	0,533464	-10
1*2*3	-0,16065	2,010226	-0,07992	0,943581	-8

C18:1



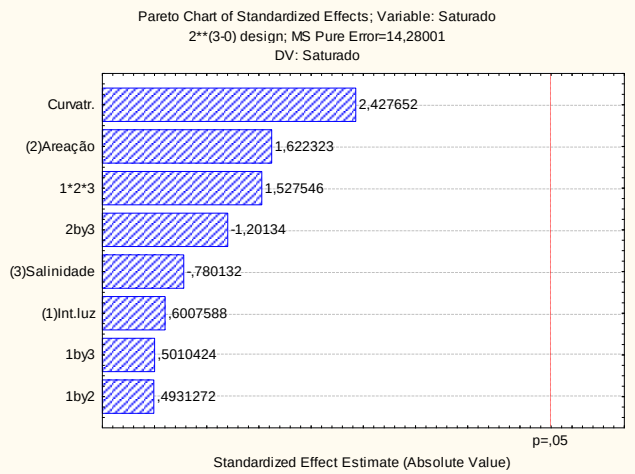
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	16,81722	0,235639	71,39903	0,000196	15,80378	17,83067
Curvatr.	5,80402	0,902044	6,43429	0,023313	1,92283	9,68520
(1)Int.luz	2,75400	0,471077	5,84618	0,028034	0,72712	4,78088
(2)Areação	0,36550	0,471077	0,77800	0,517992	-1,66038	2,39338
(3)Salinidade	-0,04540	0,471077	-0,09637	0,932010	-2,07228	1,98148
1 by 2	-0,83815	0,471077	-1,77922	0,217169	-2,86503	1,18873
1 by 3	-1,97525	0,471077	-4,19305	0,052443	-4,00213	0,05163
2 by 3	1,17335	0,471077	2,49078	0,130393	-0,85363	3,20023
1*2*3	0,40290	0,471077	0,85527	0,482506	-1,62398	2,42978

C18:3



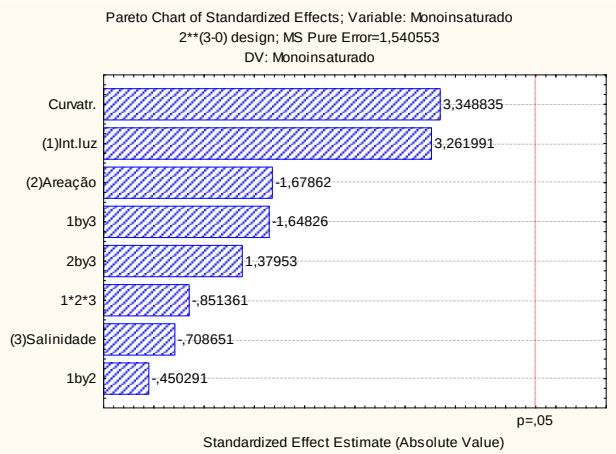
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	5,91099	0,337041	17,53790	0,003235	4,46082
Curvatr.	-0,61671	1,290768	-0,47778	0,679928	-6,17043
(1)Int.luz	-0,72592	0,674082	-1,07691	0,394166	-3,62626
(2)Areação	-1,43168	0,674082	-2,12389	0,167640	-4,33201
(3)Salinidade	0,03797	0,674082	0,05634	0,960196	-2,86236
1 by 2	-1,27757	0,674082	-1,89528	0,198531	-4,17791
1 by 3	0,03418	0,674082	0,05070	0,964174	-2,86616
2 by 3	0,61613	0,674082	0,91402	0,457192	-2,28421
1*2*3	-1,17567	0,674082	-1,74411	0,223259	-4,07601

Somatória ácidos graxos saturados



Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	35,47469	1,336040	26,55212	0,001415	29,7262
Curvatr.	12,42142	5,116642	2,42755	0,135924	-9,5937
(1)Int.luz	1,60528	2,672079	0,60076	0,609015	-9,8918
(2)Areação	4,33498	2,672079	1,62232	0,246200	-7,1621
(3)Salinidade	-2,08458	2,672079	-0,78013	0,516961	-13,5816
1 by 2	1,31768	2,672079	0,49313	0,670749	-10,1794
1 by 3	1,33883	2,672079	0,50104	0,666049	-10,1582
2 by 3	-3,21007	2,672079	-1,20134	0,352584	-14,7071
1*2*3	4,08173	2,672079	1,52756	0,266196	-7,4153

Somatória ácidos graxos monoinsaturados



Effect Estimates; Var.:Monoinsaturado; R-sqr=,93888; 2**(3-0) design; MS Pure Error=1,540553
DV: Monoinsaturado

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limit	C
Mean/Interc.	21,59507	0,438827	49,21090	0,000413	19,70595	2
Curvatr.	5,62798	1,680580	3,34883	0,078776	-1,60297	1
(1)Int.luz	2,86290	0,877654	3,26199	0,082515	-0,91334	
(2)Areação	-1,47325	0,877654	-1,67862	0,236232	-5,24949	
(3)Salinidade	-0,62195	0,877654	-0,70865	0,552006	-4,39819	
1 by 2	-0,39520	0,877654	-0,45029	0,696604	-4,17144	
1 by 3	-1,44660	0,877654	-1,64826	0,241067	-5,22284	
2 by 3	1,21075	0,877654	1,37953	0,301726	-2,56549	
1*2*3	-0,74720	0,877654	-0,85136	0,484243	-4,52344	

Anexo 2 3 Diagrama de Pareto e ANOVA dos diferentes ácidos graxos presentes no perfil lípidico no 6 dia de cultivo.

- **Comparação idade de cultivo**

Univariate Tests of Significance for peso (comparacio
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	416066,7	1	416066,7	573,1531	0,000018
Día de cultivo	2674,1	1	2674,1	3,6837	0,127376
Error	2903,7	4	725,9		

Anexo 2 4 ANOVA peso seco de biomassa (g/L)

Univariate Tests of Significance for prod (comparacion
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,007103	1	0,007103	441,6791	0,000030
Día de cultivo	0,000213	1	0,000213	13,2656	0,021922
Error	0,000064	4	0,000016		

Anexo 2 5 ANOVA produtividade de biomassa (g/Ld)

Univariate Tests of Significance for lip (comparacion d
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3005,415	1	3005,415	1900,812	0,000002
Día de cultivo	2,384	1	2,384	1,507	0,286834
Error	6,324	4	1,581		

Anexo 2 6 ANOVA lipídios (%)

Univariate Tests of Significance for DHA (comparacion
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	547,5149	1	547,5149	2202,052	0,000001
Día de cultivo	0,6389	1	0,6389	2,570	0,184199
Error	0,9946	4	0,2486		

Anexo 2 7 ANOVA DHA (%)

Univariate Tests of Significance for PUFAs (comparac
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2052,198	1	2052,198	2825,626	0,000001
Día de cultivo	3,028	1	3,028	4,169	0,110709
Error	2,905	4	0,726		

Anexo 2 8 ANOVA PUFA (%)

Univariate Tests of Significance for Clorofila A (compa
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	39,87904	1	39,87904	2434,410	0,000001
Día de cultivo	0,11329	1	0,11329	6,916	0,058201
Error	0,06553	4	0,01638		

Anexo 2 9 ANOVA Clorofila A (µg/ml)

Univariate Tests of Significance for Clorofila C (compa
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,247612	1	3,247612	608,2200	0,000016
Día de cultivo	0,000331	1	0,000331	0,0619	0,815712
Error	0,021358	4	0,005340		

Univariate Tests of Significance for Carotenoides (con
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	44,25840	1	44,25840	1440,076	0,000003
Día de cultivo	0,10415	1	0,10415	3,389	0,139451
Error	0,12293	4	0,03073		

Anexo 2 10 Clorofila C (µg/ml)

Effect	Univariate Tests of Significance for C18:1 (comparaci Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3008,253	1	3008,253	2549,026	0,000001
Día de cultivo	42,843	1	42,843	36,303	0,003823
Error	4,721	4	1,180		

Anexo 2 11 Carotenoides (µg/ml)

Effect	Univariate Tests of Significance for aC18:3 (comparac Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	135,3893	1	135,3893	292,3113	0,000069
Día de cultivo	4,3593	1	4,3593	9,4120	0,037369
Error	1,8527	4	0,4632		

Anexo 2 12 ANOVA C18:1

Anexo 2 13 ANOVA C18:3

Effect	Univariate Tests of Significance for Mono (comparacio Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4374,621	1	4374,621	3542,205	0,000000
Día de cultivo	40,337	1	40,337	32,662	0,004637
Error	4,940	4	1,235		

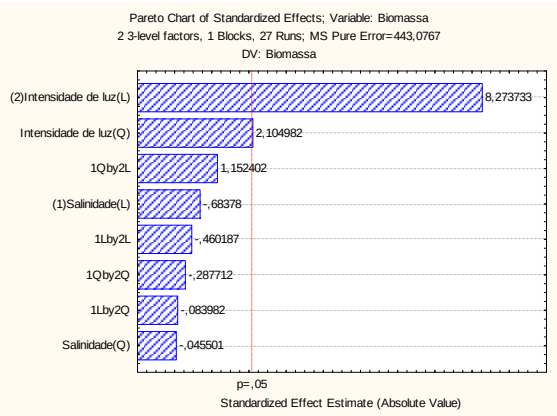
Effect	Univariate Tests of Significance for Satura (comparaci Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	9556,473	1	9556,473	1222,632	0,000004
Día de cultivo	18,929	1	18,929	2,422	0,194648
Error	31,265	4	7,816		

Anexo 2 14 ANOVA somatória Ácidos graxos Monoinsaturados

Anexo 2 15 ANOVA somatória Ácidos graxos saturados

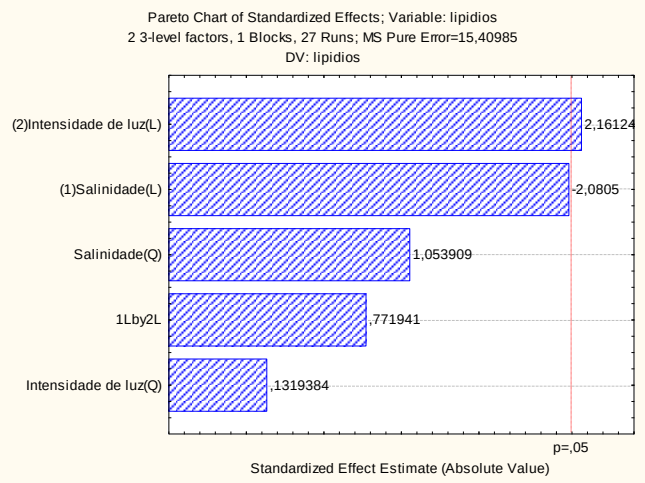
SEGUNDA ETAPA

- **Biomassa**



Anexo 2 16 Diagrama de Pareto e ANOVA de biomassa (g/L). Desenho 3^2.

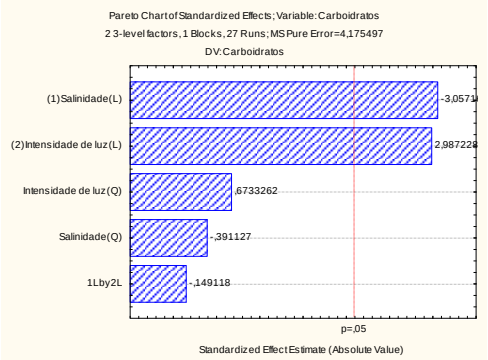
- **Lipídios**



Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p
Mean/Interc.	23,56873	0,764303	30,83691	0,000000
(1)Salinidade(L)	-3,89161	1,870523	-2,08050	0,052038
Salinidade(Q)	1,69024	1,603781	1,05391	0,305867
(2)Intensidade de luz(L)	4,00083	1,851171	2,16124	0,044398
Intensidade de luz(Q)	0,21620	1,638668	0,13194	0,896497
1L by 2L	1,70976	2,214877	0,77194	0,450166

Anexo 2 17 Diagrama de Pareto e ANOVA de lipídios (%). Desenho 3^2.

- **Carboidratos**

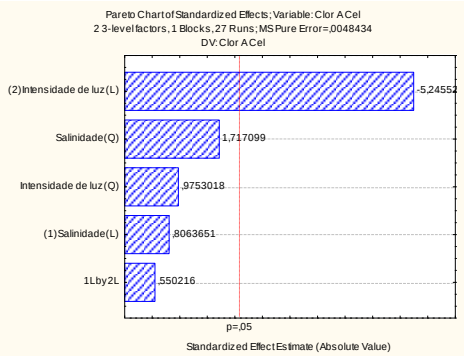


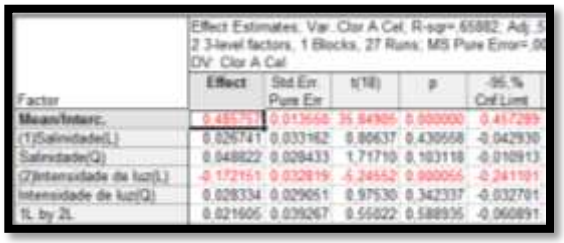
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p
Mean/Interc.	12,10645	0,397851	30,43070	0,000000
(1)Salinidade(L)	-2,97671	0,973684	-3,05716	0,006786
Salinidade(Q)	-0,32653	0,834834	-0,39113	0,700294
(2)Intensidade de luz(L)	2,87852	0,963610	2,98723	0,007902
Intensidade de luz(Q)	0,57434	0,852994	0,67333	0,509294
1L by 2L	-0,17192	1,152934	-0,14912	0,883118

Anexo 2 18 Diagrama de Pareto e ANOVA de Carboidratos (%). Desenho 3^2.

- **Pigmentos fotossintéticos (pg/cel)**

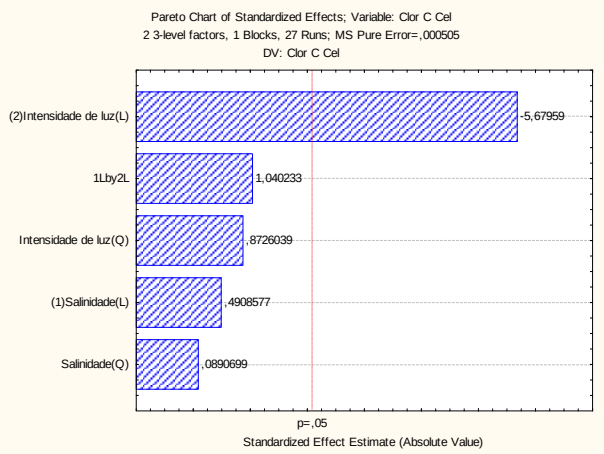
Clorofila A





Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Lims
Mean/Interc.	0,485751	0,013668	35,54385	0,000000	0,457289
(1)Salinidade(L)	0,026741	0,033162	0,80637	0,430558	-0,042930
Salinidade(Q)	0,048822	0,028433	1,71710	0,103118	-0,010913
(2)Intensidade de luz(L)	-0,172151	0,032819	-5,24552	0,000056	-0,241101
Intensidade de luz(Q)	0,028334	0,029051	0,97530	0,342337	-0,032701
1L by 2L	0,021606	0,039267	0,55022	0,588935	-0,060891

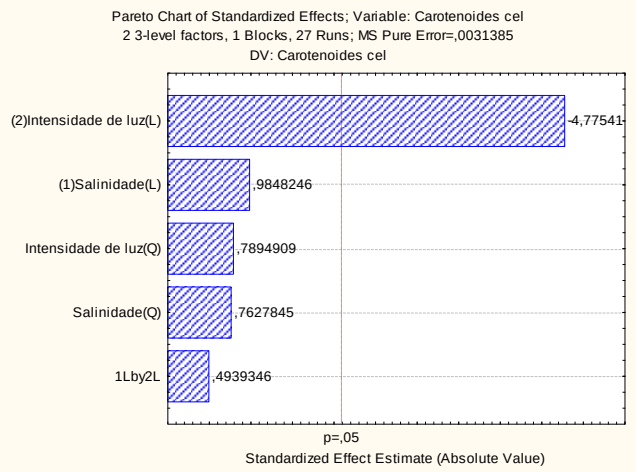
Clorofila C



Effect Estimates; Var.:Clor C Cel; R-sqr=,66298; Adj.:
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=,0
DV: Clor C Cel

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	0,151998	0,004375	34,74095	0,000000	0,142806
(1)Salinidade(L)	0,005256	0,010708	0,49086	0,629458	-0,017240
Salinidade(Q)	0,000818	0,009181	0,08907	0,930010	-0,018470
(2)Intensidade de luz(L)	-0,060186	0,010597	-5,67959	0,000022	-0,082449
Intensidade de luz(Q)	0,008185	0,009380	0,87260	0,394371	-0,011522
1L by 2L	0,013189	0,012679	1,04023	0,312003	-0,013448

Carotenoides



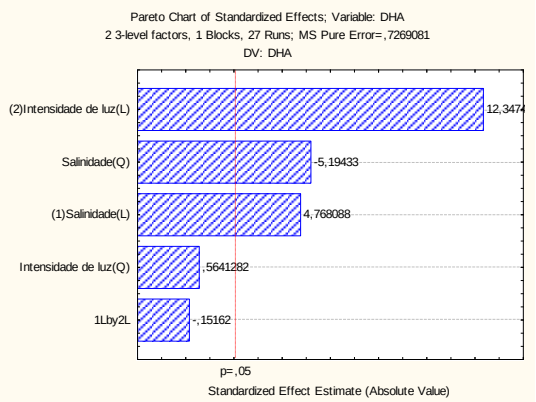
Effect Estimates; Var.:Carotenoides cel; R-sqr=,6002
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=,
DV: Carotenoides cel

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	[illegible]	0,010968	33,91938	0,000000	[illegible]
(1)Salinidade(L)	0,026290	0,026695	0,98482	0,337754	-0,029754
Salinidade(Q)	0,017459	0,022888	0,76278	0,455473	-0,030627
(2)Intensidade de luz(L)	-0,126160	0,026419	-4,77541	0,000151	[illegible]
Intensidade de luz(Q)	0,018463	0,023386	0,78949	0,440102	-0,030669
1L by 2L	0,016613	0,031689	0,49393	0,627326	-0,050796

Anexo 2 19 Diagrama de Pareto e ANOVA de pigmentos fotossintéticos (pg/cel). Desenho 32

- **Perfil de ácidos graxos**

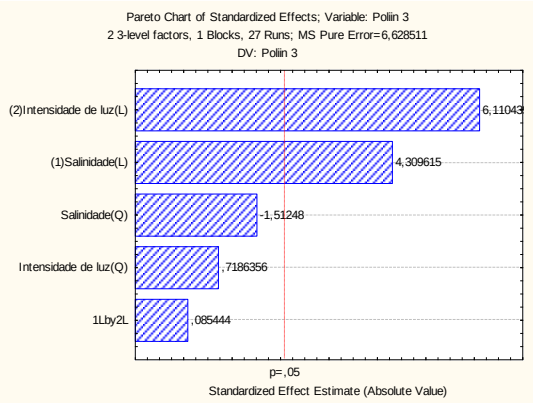
DHA



Effect Estimates; Var.:DHA; R-sqr=,87693; Adj.:,8476
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=,
DV: DHA

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	10,20639	0,165999	61,74964	0,000000	9,90164
(1)Salinidade(L)	1,93708	0,406269	4,76809	0,000154	1,08356
Salinidade(Q)	-1,80932	0,348326	-5,19433	0,000061	-2,54113
(2)Intensidade de luz(L)	4,96438	0,402056	12,34747	0,000000	4,11969
Intensidade de luz(Q)	0,20077	0,355903	0,56413	0,579629	-0,54695
1L by 2L	-0,07294	0,481050	-0,15162	0,881173	-1,08359

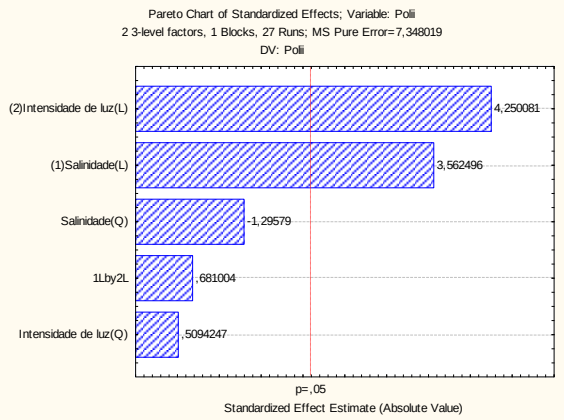
PUFAS w3



Effect Estimates; Var.:Poliin 3; R-sqr=,69632; Adj.:,62401 (Dis
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=6,628511
DV: Poliin 3

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	35,48288	0,491273	72,18046	0,000000	35,42974	37,53601
(1)Salinidade(L)	5,28701	1,226795	4,30961	0,000422	2,70961	7,86441
Salinidade(Q)	-1,59090	1,051850	-1,51248	0,147772	-3,80075	0,61896
(2)Intensidade de luz(L)	7,41870	1,214102	6,11044	0,000009	4,86796	9,96943
Intensidade de luz(Q)	0,77234	1,074731	0,71864	0,481591	-1,48559	3,03027
1L by 2L	0,12412	1,452642	0,08544	0,932952	-2,92777	3,17601

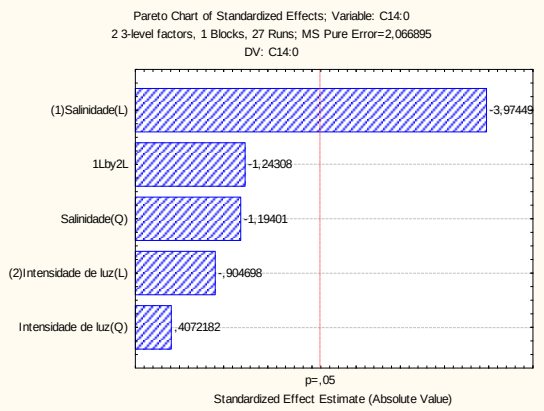
PUFAS



Effect Estimates; Var.:Polii; R-sqr=,56655; Adj.:,46335 (
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=7,3
DV: Polii

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+ Cn
Mean/Interc.	42,77734	0,527778	81,04434	0,000000	41,66461	43
(1)Salinidade(L)	4,60164	1,291662	3,56250	0,002225	1,88786	7
Salinidade(Q)	-1,43506	1,107467	-1,29579	0,211417	-3,76175	0
(2)Intensidade de luz(L)	5,43267	1,278299	4,25008	0,000482	2,74727	8
Intensidade de luz(Q)	0,57644	1,131558	0,50942	0,616643	-1,80087	2
1L by 2L	1,04166	1,529461	0,68100	0,504536	-2,17170	4

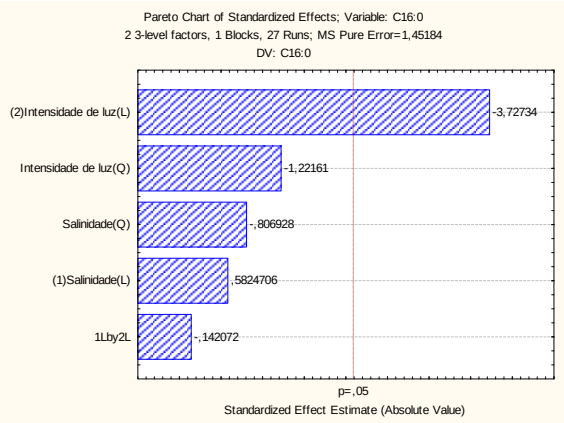
C14:0



Effect Estimates; Var.:C14:0; R-sqr=,45286; Adj.:,32259
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=2,06
DV: C14:0

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+1 Cnf
Mean/Interc.	22,36253	0,279915	79,89055	0,000000	21,77445	22,
(1)Salinidade(L)	-2,72273	0,685051	-3,97449	0,000889	-4,16197	-1,
Salinidade(Q)	-0,70132	0,587361	-1,19401	0,247971	-1,93532	0,
(2)Intensidade de luz(L)	-0,61335	0,677964	-0,90479	0,377576	-2,03770	0,
Intensidade de luz(Q)	0,24439	0,600138	0,40722	0,688660	-1,01646	1,
1L by 2L	-1,00835	0,811166	-1,24308	0,229786	-2,71254	0,

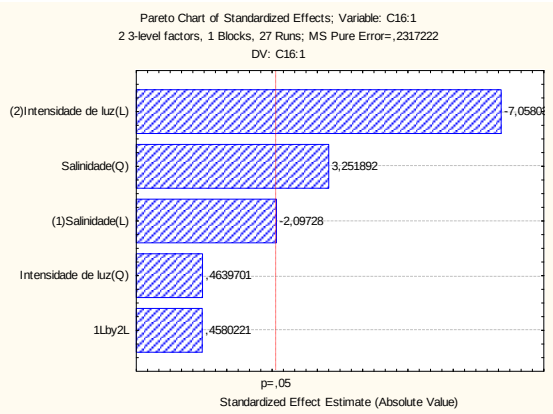
C16:0



Effect Estimates; Var.:C16:0; R-sqr=,43767; Adj.:,30378
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=1,45
DV: C16:0

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+9 Cnf.
Mean/Interc.	12,02179	0,234599	51,24406	0,000000	11,52892	12,
(1)Salinidade(L)	0,33442	0,574147	0,58247	0,567475	-0,87181	1,
Salinidade(Q)	-0,39723	0,492272	-0,80693	0,430242	-1,43145	0,
(2)Intensidade de luz(L)	-2,11790	0,568207	-3,72734	0,001542	-3,31166	-0,
Intensidade de luz(Q)	-0,61444	0,502981	-1,22161	0,237615	-1,67117	0,
1L by 2L	-0,09659	0,679845	-0,14207	0,888602	-1,52489	1,

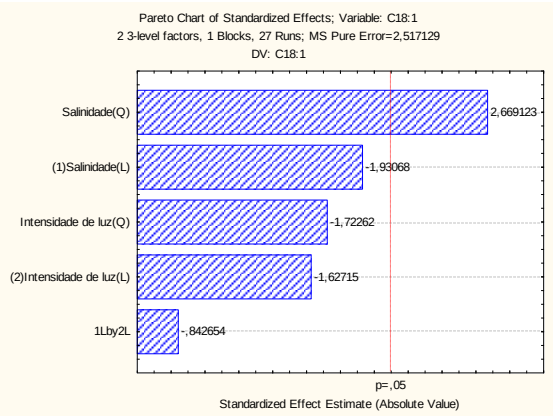
C16:1



Effect Estimates; Var.:C16:1; R-sqr=,76174; Adj.:,70501
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=,23
DV: C16:1

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+ Cnf
Mean/Interc.	4,14976	0,093724	44,27581	0,000000	3,95279	4,
(1)Salinidade(L)	-0,48106	0,229376	-2,09728	0,050358	-0,96296	0,
Salinidade(Q)	0,63954	0,196666	3,25189	0,004427	0,22636	1,
(2)Intensidade de luz(L)	-1,60219	0,227003	-7,06803	0,000001	-2,07911	-1,
Intensidade de luz(Q)	0,09323	0,200944	0,46397	0,648231	-0,32894	0,
1L by 2L	0,12440	0,271603	0,45802	0,652418	-0,44622	0,

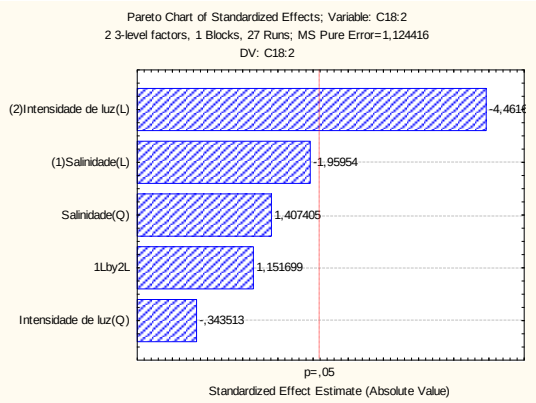
C18:1



Effect Estimates; Var.:C18:1; R-sqr=,4222; Adj.:,28463
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=2,5
DV: C18:1

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+ Cn
Mean/Interc.	15,41507	0,308901	49,90623	0,000000	14,76710	16
(1)Salinidade(L)	-1,45958	0,755991	-1,93068	0,069429	-3,04786	0
Salinidade(Q)	1,73008	0,648184	2,66912	0,015643	0,36830	3
(2)Intensidade de luz(L)	-1,21738	0,748170	-1,62715	0,121083	-2,78923	0
Intensidade de luz(Q)	-1,14087	0,662264	-1,72262	0,102094	-2,53227	0
1L by 2L	-0,75431	0,895165	-0,84265	0,410480	-2,63499	1

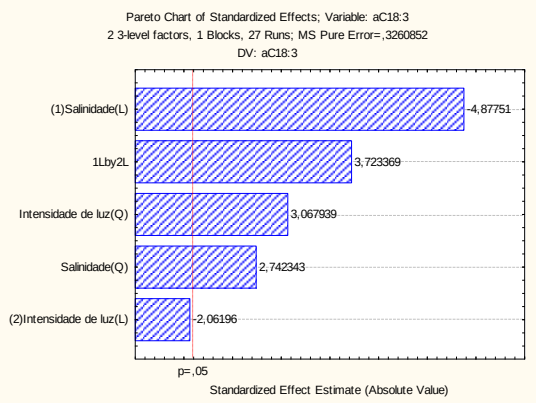
C18:2



Effect Estimates; Var.:C18:2; R-sqr=,57017; Adj.:,46783 (Diseñho
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=1,124416
DV: C18:2

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	5,19602	0,206457	25,16769	0,000000	4,76230	5,62980
(1)Salinidade(L)	-0,99011	0,505274	-1,95954	0,065722	-2,05165	0,07144
Salinidade(Q)	0,60972	0,433221	1,40740	0,176342	-0,30045	1,51988
(2)Intensidade de luz(L)	-2,23104	0,500047	-4,46167	0,000301	-3,28160	-1,18048
Intensidade de luz(Q)	-0,15205	0,442645	-0,34351	0,735193	-1,08202	0,77791
1L by 2L	0,68905	0,598293	1,15170	0,264513	-0,56791	1,94602

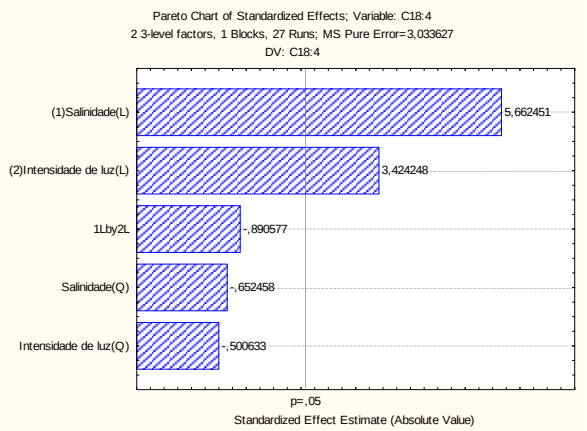
C18:3



Effect Estimates; Var.:aC18:3; R-sqr=,71352; Adj.:,64532 (
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=,3260
DV: aC18:3

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+95 Cnf.L
Mean/Interc.	6,61429	0,111181	59,49066	0,000000	6,38067	6,8
(1)Salinidade(L)	-1,32717	0,272101	-4,87751	0,000121	-1,89884	-0,7
Salinidade(Q)	0,63978	0,233298	2,74234	0,013389	0,14964	1,1
(2)Intensidade de luz(L)	-0,55526	0,269285	-2,06196	0,053952	-1,12100	0,0
Intensidade de luz(Q)	0,73131	0,238373	3,06794	0,006628	0,23051	1,2
1L by 2L	1,19964	0,322193	3,72337	0,001656	0,52274	1,8

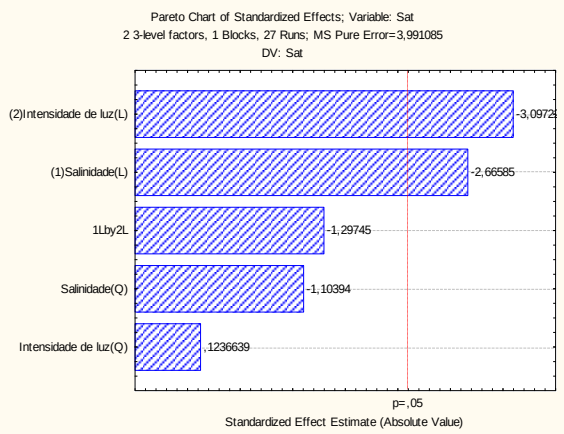
C18:4



Effect Estimates; Var.:C18:4; R-sqr=,68977; Adj.:,61591 (
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=3,03
DV: C18:4

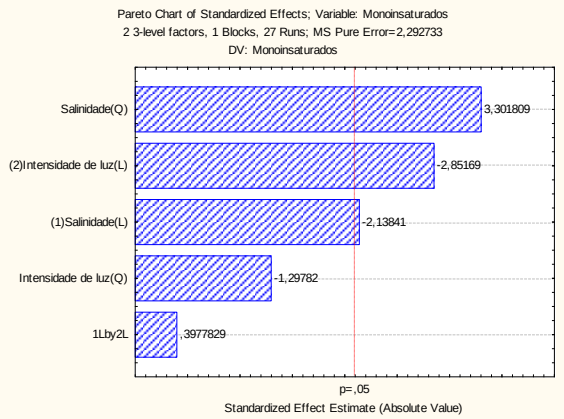
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+9 Cnf.
Mean/Interc.	18,62319	0,339115	55,00163	0,000000	18,21073	19,4
(1)Salinidade(L)	4,69949	0,829937	5,66245	0,000023	2,95584	6,4
Salinidade(Q)	-0,46428	0,711585	-0,65246	0,522352	-1,95926	1,0
(2)Intensidade de luz(L)	2,81251	0,821350	3,42425	0,003025	1,08691	4,5
Intensidade de luz(Q)	-0,36399	0,727064	-0,50063	0,622695	-1,89150	1,1
1L by 2L	-0,87519	0,982724	-0,89058	0,384906	-2,93982	1,1

Somatória ácidos graxos saturados



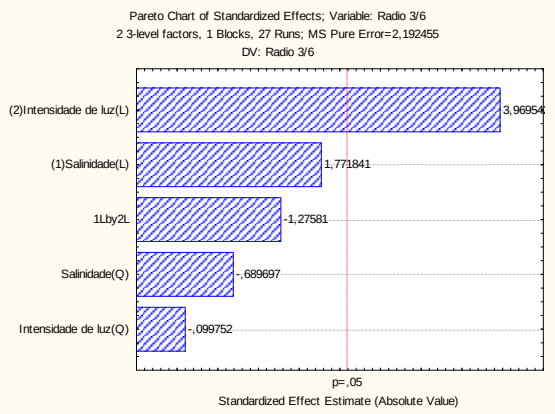
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	35,12582	0,388964	90,30020	0,000000	34,30964	35,94452
(1)Salinidade(L)	-2,53779	0,951940	-2,66585	0,015752	-4,53768	-0,53779
Salinidade(Q)	-0,90102	0,816190	-1,10394	0,284159	-2,61578	0,81373
(2)Intensidade de luz(L)	-2,91787	0,942091	-3,09722	0,006217	-4,89713	-0,93861
Intensidade de luz(Q)	0,10313	0,833945	0,12366	0,902952	-1,64892	1,85618
1L by 2L	-1,46247	1,127187	-1,29745	0,210859	-3,83060	0,90566

Somatória ácidos graxos monoinsaturados



Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	20,87538	0,294811	70,82306	0,000000	20,26981	21,4
(1)Salinidade(L)	-1,54288	0,721507	-2,13841	0,046447	-3,05871	-0,0
Salinidade(Q)	2,94256	0,618618	3,30181	0,003965	0,74289	3,1
(2)Intensidade de luz(L)	-2,03623	0,714043	-2,85169	0,010693	-3,53637	-0,5
Intensidade de luz(Q)	-0,82032	0,632975	-1,29782	0,210734	-2,14826	0,5
1L by 2L	0,33964	0,854333	0,39778	0,695468	-1,45505	2,1

Ômega 3/6



Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	-95,% Cnf.Limit	+95,% Cnf.Limit
Mean/Interc.	5,5955	0,265291	21,17832	0,000000	4,41985	6,771204
(1)Salinidade(L)	1,25013	0,705552	1,77184	0,093349	-0,23218	2,732437
Salinidade(Q)	-0,41722	0,604939	-0,68970	0,499181	-1,68815	0,853704
(2)Intensidade de luz(L)	2,77174	0,698253	3,96954	0,000899	1,30477	4,238718
Intensidade de luz(Q)	-0,06166	0,618088	-0,09975	0,921644	-1,36023	1,236919
1L by 2L	-1,06596	0,835441	-1,27581	0,218242	-2,82106	0,689334

Anexo 2 20 Diagrama de Pareto e ANOVA do perfil de ácidos graxos (%). Desenho 32