



PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* E *Chlorella minutissima* CULTIVADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Jorge Alberto Vieira COSTA*
Elisangela Martha RADMANN**
Vanessa Sacramento CERQUEIRA**
Glória Cristina dos SANTOS**
Maurício Neves CALHEIROS**

■RESUMO: Estudos recentes têm explorado o uso de microalgas para obtenção de lipídios, principalmente os de maior valor comercial como o ácido γ -linolênico. A microalga *Chlorella* possui ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas e alto conteúdo protéico, e, além disso, possui o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe). O objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima*, a fim de verificar o perfil de ácidos graxos frente à variação de diferentes fatores físico-químicos e nutricionais. Foi utilizado um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}_{IV} para cada cepa estudada, onde foram variados os fatores temperatura, iluminância, fonte de carbono e concentração de nitrato no meio de cultivo. *C. vulgaris* cultivada a 35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻ apresentou biomassa máxima de 5,06 g.L⁻¹ em 22 dias de cultivo. Para *C. minutissima* foi obtida biomassa máxima de 1,5g.L⁻¹ em 22 dias quando cultivada a 35°C, 1250 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 0,5 g.L⁻¹ de NO₃⁻. Os maiores teores de lipídios obtidos para *C. vulgaris* e *C. minutissima* foram 6,96% e 7,98%, respectivamente. A 35°C e 2500 Lux foi obtido 7,66% de ácido linolênico.

■PALAVRAS-CHAVE: Ácidos graxos; *Chlorella*; lipídios; microalga.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com microalgas, em relação a sua utilização como alimento, na agricultura, no tratamento de águas residuais, na obtenção de diversos compostos com alto valor agregado, como corantes e ácidos graxos, e também para biofixar CO₂ da atmosfera.^{6, 13, 21, 23, 27} As microalgas podem apresentar de 1 a 40% de lipídios, e em determinadas condições de cultivo, pode alcançar 85%.³

O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens como a simplicidade de nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade

de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico, como os ácidos graxos. Diversos fatores podem influenciar na produção de lipídios e ácidos graxos por microalgas, como intensidade luminosa,³¹ temperatura²⁶ e nutrientes.^{31, 33} A biomassa microalgal comparada com outras fontes de ácidos graxos apresenta ausência de contaminação e ainda certas microalgas possuem significativamente maior espectro de PUFA, alguns com cadeias com mais de 18 átomos de carbono.³⁷

Os ácidos graxos são importantes constituintes da dieta humana, apresentando efeitos terapêuticos e desempenhando importante papel tecnológico na indústria de alimentos. Os ácidos graxos extraídos de microalgas podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis.⁵ Os principais ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são o ácido linoléico, ácido linolênico, araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA).² O ácido γ -linolênico (C18:3, ω -6, GLA) é necessário para síntese do ácido araquidônico e prostaglandinas. O perfil de ácidos graxos é determinante nas propriedades físicas, químicas e sensoriais dos alimentos. Os ácidos EPA e DHA podem atuar na prevenção e tratamento de várias doenças, como cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer.²⁹

A microalga *Chlorella* possui grande capacidade fotossintética, é rica em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos.¹² Além disso, *Chlorella* é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA, podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana. Segundo alguns autores, *Chlorella* apresenta efeito terapêutico,^{16, 25} é utilizada como ração animal¹⁹ e como suplemento alimentar.¹

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do cultivo, o conteúdo lipídico e o perfil gás-cromatográfico dos ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* expostas a diferentes condições de cultivo.

*Laboratório de Engenharia Bioquímica - Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul - FURG - 96201-900 - Rio Grande do Sul - RS - Brasil.

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos - Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul - FURG - 96201-900 - Rio Grande do Sul - RS - Brasil

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas as microalgas *C. vulgaris* LEB-104 e *C. minutissima* LEB-108. As cepas de *Chlorella* foram obtidas junto à coleção de culturas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O meio de cultivo utilizado na manutenção dos inóculos e cultivos foi Meio Bristol Modificado - MBM.³⁶

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo erlenmeyer de 2 L com volume inicial de 1,8 L e concentração inicial de microalga de 0,15 g.L⁻¹. A aeração foi realizada através de bombas de diafragma misturado ao gás CO₂ (1% v/v), quando a fonte de carbono era CO₂, disposto em cilindros industriais. A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 750 mL.min⁻¹ durante o período claro, controlado através de válvulas solenóides. O aparato experimental foi mantido em câmara termostatizada, com fotoperíodo de 12h claro/escuro.⁸ A iluminância foi 3200 Lux fornecida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W, tipo luz do dia, medida através de luxímetro digital.

Planejamento experimental e Análise estatística

Para o estudo foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹_{IV} (Tabela 1), onde os fatores foram temperatura (30 e 35°C), iluminância (1250 e 2500 Lux), fonte de carbono (16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 1% v/v de CO₂) e concentração de nitrato (0,5 e 1,0 g.L⁻¹). Foram estudadas as respostas biomassa máxima (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}) e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max})

para as duas microalgas.

Os resultados de concentração final de biomassa, teor de lipídios totais e perfil de ácidos graxos da microalga *Chlorella* foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 80% (p≤0,20).

Determinações analíticas

Diariamente as amostras foram coletadas assepticamente para determinação da biomassa, calculada através da densidade óptica a 670 nm,⁶ em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 com auxílio de curva de calibração pré-determinada.

Quantificação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídios totais foi utilizada a metodologia proposta por Bligh & Dyer,⁴ com uma etapa prévia de rompimento da parede celular através de banho ultrassônico.

A determinação dos ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás (Varian - 3400 CX) equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar CPSil 88. A coluna possuía 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno com um filme de 0,2 μm de espessura. O gás de arraste foi o hidrogênio UP, com fluxo a 0,8 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna de 140°C aumentando 1°C.min⁻¹ até 185°C, em 45 min de programação. O tipo de injeção foi *split* 1:50 e a quantidade de amostra injetada foi 1 μL. Os ácidos graxos foram identificados pela

Tabela 1 - Biomassa máxima (X_{max}, g.L⁻¹) produtividade máxima (P_{max}, g.L⁻¹.dia⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}, dia⁻¹) e concentração de lipídios (% p/p) obtidos para *C. vulgaris* cultivadas em diferentes condições.

Ensaio	Variáveis codificadas				<i>C. vulgaris</i>			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X _{max}	P _{max}	μ _{max}	Lipídios
V1	-1	-1	-1	-1	0,48	0,03	0,06	4,59
V2	+1	-1	-1	+1	1,00	0,05	0,08	1,94
V3	-1	+1	-1	+1	0,46	0,03	0,08	5,79
V4	+1	+1	-1	-1	2,62	0,15	0,07	5,30
V5	-1	-1	+1	+1	0,80	0,03	0,06	6,59
V6	+1	-1	+1	-1	1,25	0,07	0,08	6,02
V7	-1	+1	+1	-1	0,60	0,02	0,09	6,80
V8	+1	+1	+1	+1	5,06	0,23	0,09	6,96

X₁: Temperatura [30°C (-) e 35°C (+)]; X₂: Iluminância [1250 Lux (-) e 2500 Lux (+)]; X₃: Fonte de carbono [CO₂ (-) e NaHCO₃ (+)]; X₄: Concentração de NO₃ [0,5 g.L⁻¹ (-) e 1,0 g.L⁻¹ (+)].

comparação dos tempos de retenção com padrões, e quantificados por normalização de áreas, através do *software* Work Station 4.0.

Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Bellefonte, EUA) foram: ácido capróico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanóico (C11:0); ácido láurico (C12:0); ácido mirístico (C14:0); ácido miristoléico (C14:1); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoléico (C16:1); ácido margarico (C17:0); ácido margaroléico (C17:1); ácido esteárico (C18:0); ácido elaidico (C18:1); ácido oléico (C18:1); ácido linoléico trans (C18:2); ácido linoléico cis (C18:2); ácido α -linolênico (C18:3); ácido γ -linolênico (C18:3); ácido araquídico (C20:0); ácido gadoléico (C20:1); ácido eicosadienóico (C20:2); ácido eicosatrienóico (C20:3); ácido bênio (C22:0); ácido eicosapentaenóico (C20:5); ácido erúico (C22:1); ácido lignocérico (C24:0); ácido miristoléico (C24:1). Os padrões⁷ foram diluídos em hexano e injetados na quantidade de 1 μ L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados da biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e teor de lipídios para as microalgas *C. vulgaris* e *C. minutissima* cultivadas em diferentes condições.

A microalga *C. vulgaris* alcançou 5,06 g.L⁻¹ em 22 dias de cultivo, quando exposta a 35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻. Quando cultivada com adição de 1% (v/v) de CO₂ no meio, *C. vulgaris* apresentou 2,62 g.L⁻¹. Resultados inferiores foram encontrados por Yanagi et al.,³⁹

onde *Chlorella* sp. HA-1 obteve aproximadamente 0,40 g.L⁻¹ em meio contendo 10% de CO₂. Sung et al.,³² em estudo com *Chlorella* sp. KR-1, verificaram que a microalga apresentou maior concentração celular (5,70 g.L⁻¹) com adição de 10% de CO₂. Lee et al.¹⁸ obtiveram em torno de 2,00 g.L⁻¹ para a microalga *Chlorella* sp. KR-1 cultivada em meio com 15% de CO₂. O CO₂ é considerado um nutriente essencial no cultivo de microalgas,³⁵ e a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal. Algumas microalgas são tolerantes a temperaturas elevadas, como *Chlorella*, que continua se desenvolvendo em temperaturas em torno de 42°C.²⁸ Para a microalga *C. minutissima*, a biomassa máxima obtida foi 1,53 g.L⁻¹ no ensaio com 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃, 35°C, 1250 Lux e 0,5 g.L⁻¹ de NO₃⁻. Segundo Fox,¹⁰ a temperatura ótima para cultivo de microalgas está entre 35 e 37°C.

As máximas produtividades para as duas microalgas foram alcançadas nos ensaios V8 e M8 (35°C, 2500 Lux; 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃; 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻), o que está relacionado com um crescimento mais rápido no mesmo intervalo de tempo, devido a maior concentração de nutrientes no meio e fatores que favoreceram a fotossíntese, tais como temperatura e iluminância.

A máxima velocidade específica de crescimento foi alcançada para a microalga *C. vulgaris* exposta a 35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻. Para microalga *C. minutissima* o maior valor da velocidade específica foi obtido para 30°C, 1250 Lux, CO₂ e 0,5 g.L⁻¹ de NO₃⁻. Estes resultados mostram que cultivos com a microalga *Chlorella* suportam maiores concentrações de carbono, conforme anteriormente citado por Hanaga et al.,¹¹ onde cepas de *Chlorella* cresceram em concentrações acima de 50% de CO₂.

Tabela 2 - Biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L⁻¹) produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, g.L⁻¹.dia⁻¹), velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$, dia⁻¹) de crescimento e concentração de lipídios (% p/p) obtidos para *C. minutissima* cultivadas em diferentes condições.

Ensaio	Variáveis codificadas				<i>C. minutissima</i>			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X _{máx}	P _{máx}	$\mu_{\text{máx}}$	Lipídios
M1	-1	-1	-1	-1	0,89	0,05	0,17	6,64
M2	+1	-1	-1	+1	1,24	0,05	0,10	5,14
M3	-1	+1	-1	+1	1,38	0,05	0,07	4,76
M4	+1	+1	-1	-1	1,40	0,06	0,09	5,41
M5	-1	-1	+1	+1	0,69	0,04	0,06	6,69
M6	+1	-1	+1	-1	1,53	0,06	0,09	6,51
M7	-1	+1	+1	-1	1,19	0,04	0,07	7,98
M8	+1	+1	+1	+1	1,16	0,06	0,13	4,72

X₁: Temperatura [30°C (-) e 35°C (+)]; X₂: Iluminância [1250 Lux (-) e 2500 Lux (+)]; X₃: Fonte de carbono [CO₂ (-) e NaHCO₃ (+)]; X₄: Concentração de NO₃ [0,5 g.L⁻¹ (-) e 1,0 g.L⁻¹ (+)].

Outro motivo é a baixa concentração de NO_3^- no meio de cultivo. Quando o nitrogênio é fornecido sob a forma oxidada de nitrato ele necessita ser reduzido para incorporar-se à célula na forma de moléculas orgânicas. Seguindo o carbono, hidrogênio e oxigênio, o nitrogênio é o elemento de maior importância na composição da matéria seca das microalgas, podendo variar entre 1 e 10% na proporção celular.^{15,30}

Para as microalgas *C. vulgaris* e *C. minutissima* foi obtido 6,96 e 7,98% de lipídios, nos ensaios V8 (35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO_3 , 1,0 g.L⁻¹ de NO_3^-) e M7 (30°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO_3 , 0,5 g.L⁻¹ de NO_3^-), respectivamente. Segundo Illman et al.,¹³ 30°C e baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*, o que foi evidenciado para *C. minutissima*. Para esta microalga, baixas intensidades luminosas contribuíram para o aumento de lipídios, o que pode ter causado o baixo teor lipídico para as condições do ensaio M8.

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *C. minutissima*, onde se observa que apresentaram fase de adaptação de aproximadamente 50 h de cultivo seguido de fase exponencial.

C. vulgaris e *C. minutissima* não apresentaram fase de morte celular após os 22 dias quando expostas às diferentes condições de cultivo. Na Figura 1a é possível observar que o ensaio V8 (35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO_3 , 1,0 g.L⁻¹ de NO_3^-) apresentou fase de crescimento logarítmico mais longa do que os demais ensaios. Os ensaios M3 (30°C, 2500 Lux, CO_2 , 1,0 g.L⁻¹ de NO_3^-), 4 (35°C, 2500 Lux, CO_2 , 0,5 g.L⁻¹ de NO_3^-) e M6 (35°C, 1250 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO_3 , 0,5 g.L⁻¹ de NO_3^-), mostrados na Figura 1b, apresentaram comportamento semelhante, com fase de crescimento logarítmico mais curta que os apresentados nos ensaios de *C. vulgaris*.

Análise do Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹_{IV}

A microalga *C. vulgaris* apresentou aumento na biomassa quando submetida às condições superiores do delineamento exploratório proposto. Para a microalga *C. minutissima*, foi favorável o uso de CO_2 para crescimento celular. Laing¹⁷ obteve aumentos de 2 a 5 vezes nas densidades celulares e na biomassa quando adicionou CO_2 aos cultivos. Segundo Ishida et al.,¹⁴ a adição de CO_2 pode aumentar até 7 vezes a produtividade. Comparadas aos vegetais superiores, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética, produzindo biomassa de alto valor nutricional e compostos químicos de valor comercial, como ácidos graxos.

Ambas as microalgas estudadas apresentaram aumento significativo ($p=0,1030$) na produtividade máxima quando a temperatura utilizada passou de 30°C para 35°C, sendo superior para microalga *C. vulgaris* (0,097 g.L⁻¹.dia⁻¹). Em estudos realizados por Sung et al.³² a microalga *Chlorella* sp. KR-1 apresentou crescimento até 40°C.

Através da análise estatística (Tabela 3) verificou-se que, para a microalga *C. vulgaris*, a fonte de carbono e a iluminância causaram um aumento significativo de 2,18% ($p=0,0630$) e 1,43% ($p=0,1550$), respectivamente, sobre a resposta teor de lipídios quando se utilizou 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO_3 no meio de cultivo e iluminância de 2500 Lux, sendo que para as demais respostas os efeitos não foram significativos ($p>0,20$). Os fatores temperatura, fonte de carbono e concentração de NO_3^- , causaram um decréscimo de 1,07% ($p=0,0870$); 0,53% ($p=0,1040$) e 1,31% ($p=0,0550$), respectivamente, no teor de lipídico, quando a microalga foi exposta a 35°C; 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO_3 no meio de cultivo e 1,0 g.L⁻¹ de NO_3^- . Os resultados apresentados discordam dos estudos realizados por Illman et al.,¹³ onde

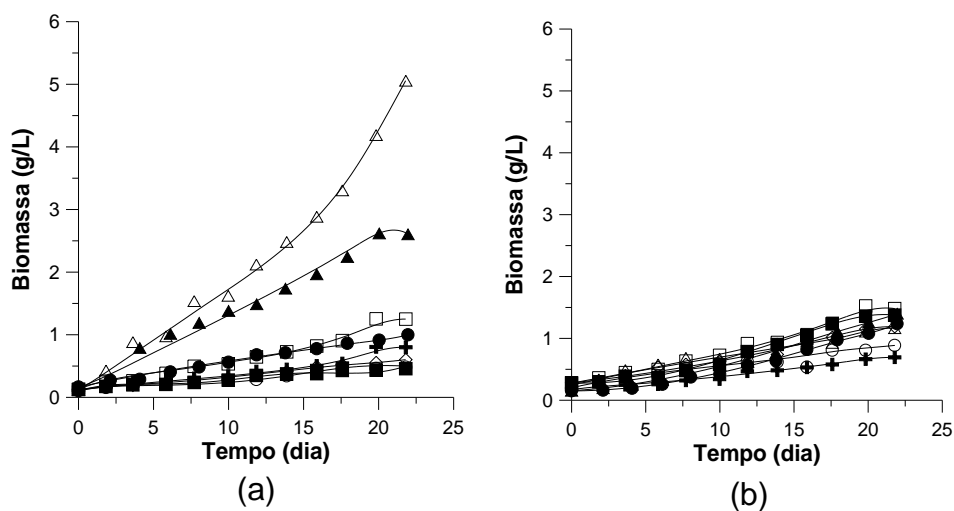


FIGURA 1 - Curvas de crescimento para as microalgas cultivadas segundo o planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹_{IV}. (a) *Chlorella vulgaris* (V) e (b) *Chlorella minutissima* (M): ensaios 1 (○), 2 (●), 3 (■), 4 (▲), 5 (+), 6 (□), 7 (◇) e 8 (△).

revelam que 30°C e baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios e ácidos graxos, assim como baixas intensidades luminosas e baixas concentrações de fonte de carbono no meio de cultivo.

Perfil de ácidos graxos

As Tabelas 3 e 4 mostram a composição dos ácidos graxos das microalgas *C. vulgaris* e *C. minutissima*, e os efeitos estimados das variáveis para cada ensaio do Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹_{IV}.

Para *C. vulgaris* o ácido palmitoléico (C16:1) foi o ácido graxo observado em maior concentração e para a *C. minutissima* predominaram os ácidos palmitoléico (C16:1) e o araquídico (C20:0). Houve predomínio do ácido palmitoléico (C16:1), variando de 20 a 83% para ambas microalgas. Este ácido graxo monoinsaturado é um importante constituinte da dieta humana, auxiliando na prevenção de diversas doenças, dentre elas, as cardiovasculares.³⁸ As maiores concentrações de ácido palmitoléico foram obtidas quando se utilizou temperatura mais elevada (35°C) e 1% (v/v) de CO₂ como fonte carbono.

No presente trabalho, quando se utilizou 1% v/v de CO₂ como fonte de carbono, os ácidos graxos que se

apresentaram em maior quantidade foram: os ácidos palmítico (26,51%), ácido palmitoléico (33,19%), ácido linoléico (17,35%) e ácido araquidônico (40,94%). Estudos realizados por Colla et al.,⁶ Olguín et al.,²⁴ Deshniem et al.,⁹ com diferentes espécies de microalgas, mostraram que houve predominância do ácido palmítico. Segundo Tsuzuki et al.,³⁵ a adição de CO₂ aos cultivos influencia no conteúdo lipídico e no grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo este, portanto, um nutriente essencial no cultivo de microalgas. Yanagi et al.,³⁹ cultivando *Chlorella* sp. HA-1 com 10% v/v de CO₂, obtiveram 14,2% de ácido palmítico, 13,4% de ácido linoléico e 26,5% de ácido linolênico. Os PUFA, neste trabalho, variaram de 18,01 a 35,60% para *C. vulgaris* e 2,41 a 13,01% para *C. minutissima*. Resultados inferiores foram encontrados por Morais,²² onde obtiveram 5,40; 19,20 e 24,40% de PUFA para as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, cultivadas com 12% de CO₂.

Para *C. vulgaris*, a variação da temperatura apresentou efeito positivo de 2,35% para o ácido γ -linolênico (C18:3, p=0,0858) e a variação da iluminância e fonte de carbono ocasionou decréscimo médio de 1,40% no teor de ácido mirístico (C14:0, p=0,0339) e de 5,70% no ácido palmítico (C16:0, p=0,1089). Para *C. minutissima* a temperatura levou ao decréscimo de 5,30% para o ácido palmítico (C16:0,

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *Chlorella vulgaris* e *C. minutissima* mantidas nas condições do Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹_{IV}.

Ensaio	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
<i>C. vulgaris</i>								
V1	4,36	26,51	30,27	3,64	5,72	14,84	4,62	10,03
V2	4,35	25,54	29,17	3,62	5,61	15,21	5,99	10,52
V3	3,19	19,73	23,65	3,35	14,69	17,35	5,61	12,42
V4	2,47	13,00	23,06	2,87	13,49	15,22	6,00	23,90
V5	2,44	13,24	20,10	2,47	34,13	13,63	4,38	9,62
V6	3,54	11,67	28,74	5,76	3,61	27,08	8,52	11,08
V7	1,70	10,74	35,72	3,00	16,63	18,91	4,15	9,15
V8	1,71	10,68	27,96	1,38	17,31	22,31	7,66	11,01
<i>C. minutissima</i>								
M1	3,74	21,68	33,19	4,42	6,96	7,39	nd	22,62
M2	3,38	4,55	23,64	2,78	11,86	12,30	0,55	40,94
M3	1,07	11,97	27,71	3,20	10,98	10,95	0,37	33,74
M4	0,85	8,21	26,93	3,06	9,28	12,41	0,54	38,72
M5	5,97	7,31	24,33	2,71	9,12	1,25	2,16	37,15
M6	1,91	10,42	34,70	3,87	3,25	11,24	0,58	29,02
M7	1,21	10,73	33,56	3,62	14,71	12,45	0,56	23,15
M8	0,35	6,32	82,63	1,06	1,68	2,35	0,06	5,55

C14:0, ácido mirístico; C16:0, ácido palmítico; C16:1, ácido palmitoleico; C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oléico; C18:2, ácido linoléico; C18:3, ácido linolênico; C20:0, ácido araquídico. nd = não detectado.

p=0,2027) e um aumento de 7,29% para o ácido araquídico (C20:0, p=0,1310). A iluminância não apresentou efeitos significativos (p>0,2000). A mudança na fonte de carbono apresentou um aumento de 1,00% para o ácido linolênico (C18:3, p=0,0976). O aumento da concentração de NO₃⁻ no meio de cultivo levou ao decréscimo de 0,89% para o ácido esteárico (C18:0, p=0,0686) e aumento de 0,89% para o ácido linolênico (C18:3, p=0,1244) e de 8,87% para o ácido araquídico (C20:0, p=0,0870). Colla et al.⁷ verificaram que a temperatura de 35°C, incrementou o conteúdo dos ácidos palmitoléico (C16:1) e linoléico (C18:2), e com menores concentrações de nitrato no meio de cultivo, favoreceram a produção do ácido palmitoléico (C16:1). Com os resultados apresentados, nota-se que a influência significativa foi obtida somente para as condições dos níveis inferiores do delineamento exploratório 2⁴⁻¹_{IV} (30°C, 1250 Lux, CO₂, 0,5 g.L⁻¹ de NO₃⁻), com exceção do fator fonte de carbono, que não apresentou efeito significativo para nenhum ácido graxo encontrado na microalga *C. minutissima*. Estudos anteriores mostraram que a temperatura é muito importante na produção de ácidos graxos por diversos microrganismos.^{26,34} Maslova et al.²⁰ cultivaram a cianobactéria *Synechococcus* sp. e observaram que o ácido palmítico apresentou maior concentração à 32°C.

CONCLUSÕES

A microalga *C. vulgaris* apresentou biomassa máxima de 5,06 g.L⁻¹ quando cultivada a 35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹

de NaHCO₃ e 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻. O maior conteúdo lipídico foi 7,98% para *C. minutissima* cultivada a 30°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 0,5 g.L⁻¹ de NO₃⁻.

O perfil de ácidos graxos obtido para a microalga *C. vulgaris* cultivada a partir das diferentes condições mostrou ser o ácido palmitoléico (C16:1) o mais abundante, apresentando concentração variando de 4,05% a 68,39%. *C. vulgaris* cultivada a 35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻, apresentou 7,66% de ácido linolênico (C18:3). A *C. minutissima* apresentou maior concentração de ácido araquídico (C20:0), variando de 22,62% a 40,94%.

A biomassa obtida do cultivo das microalgas *C. vulgaris* e *C. minutissima*, em diferentes condições, apresentou-se rica em ácidos graxos, podendo estes ser utilizados tanto na alimentação (ácidos graxos insaturados), quanto na produção de biocombustíveis (ácidos graxos saturados).

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Fatty acids profile the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* grown under different conditions. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.17, n.4, p.429-436, out./dez. 2006.

■ **ABSTRACT:** Recent researches have explored the use of microalgae for the lipid production, mainly those with higher commercial value like γ -linolenic acid. The green alga *Chlorella* presents polyunsaturated fatty acids, vitamins and high protein contents, and, besides, has the GRAS certificate

Tabela 4 - Efeitos principais (%) dos fatores estudados sobre o perfil de ácidos graxos para as microalgas *C. vulgaris* e *C. minutissima*.

Variável	Efeitos principais							
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
<i>C. vulgaris</i>								
X ₁	0,09	-2,33	-0,20	0,29	-7,79	3,77	2,35*	3,82
X ₂	-1,40*	-5,70*	0,53	-1,22	3,26	0,76	-0,02	3,81
X ₃	-1,24*	-9,61*	1,59	-0,22	8,04	4,83	0,62	-4,00
X ₄	-0,09	1,82	-4,23	-1,11	8,07	-1,89	0,09	-2,65
<i>C. minutissima</i>								
X ₁	0,03	-5,30*	-2,30	-0,38	-2,06	3,79	0,18	7,29*
X ₂	-1,47	-1,43	-0,83	-0,30	3,22	3,72	0,08	0,76
X ₃	1,50	-2,66	1,36	-0,14	-0,72	-1,71	1,00*	-2,40
X ₄	2,17	-4,97	-7,09	-0,89*	1,72	-1,93	0,89*	8,87*

X₁: Temperatura; X₂: Iluminância; X₃: Fonte de carbono; X₄: Concentração de NO₃⁻. C14:0, ácido mirístico; C16:0, ácido palmítico; C16:1, ácido palmitoleico; C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oléico; C18:2, ácido linoléico; C18:3, ácido linolênico; C20:0, ácido araquídico. * Efeito significativo ao nível de 80% de confiança.

(Generally Recognized As Safe). The main of this work was to growth of the microalgae *C. minutissima* and *C. vulgaris*, in order to determine the fatty acids profile with the variation of physical-chemical and nutritional factors. An experimental design 2^{4-1}_{IV} was used for each strain studied, where the factors temperature, luminance, carbon source and nitrate concentration in the medium were studied. For *C. vulgaris* cultivated at 35°C, 2,500 Lux, 16.8 g.L⁻¹ NaHCO₃ and 1.0 g.L⁻¹ NO₃⁻ the maximum biomass was 5.06 g.L⁻¹ after 22 days, and for *C. minutissima* the maximum biomass was 1.5g.L⁻¹ after 22 days when cultivated at 35°C; 1,250 Lux, 16.8 g.L⁻¹ NaHCO₃ and 0.5 g.L⁻¹ NO₃⁻. The higher lipid contents obtained for *C. vulgaris* and *C. minutissima* were 6.96% and 7.98%, respectively. At 35°C and 2,500 Lux the linolenic acid concentration was 7.66%.

■ **KEYWORDS:** Fatty acids; *Chlorella*; lipids; microalga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADOA, F. P.; NANDINIA, S.; SARMA, S. Differences in population growth of rotifers and cladocerans raised on algal diets supplemented with yeast. **Limnologica**, v. 35, p. 298-303, 2005.
- ALONSO, D.; MAROTO, F. Plant as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnol. Adv.**, v. 18, p. 481-497, 2000.
- BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed) **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p.312-351.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BROWN, M. L.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energ. Convers. Manage.**, v. 34, p. 1005-1013, 1993.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Z. Naturforsch.**, v. 59c, p. 55-59, 2004.
- COLLA, L. M. et al. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.
- COSTA, J. A. V. et al. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology World. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 603-607, 2002.
- DESHNIUM, P. et al. Temperature-independent and dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthospira* sp. PCC 9438). **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 184, p. 207-213, 2000.
- FOX, R, D. **Spirulina production & potencial**. France: Edisud, 1996. p.232.
- HANAGA, N. et al. Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3345-3348, 1992.
- HENRIKSON R. **Microalga Spirulina: superalimento del futuro**. Barcelona: Urano, 1994. 222p.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 631-635, 2000.
- ISHIDA, Y. et al. A highly CO₂-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fish. Sci.**, v. 66, p. 655-659, 2000.
- KAPLAN, D. et al. Algal nutrition. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 174-178.
- KOMAKI, H. et al. The effect of processing of *Chlorella vulgaris*: K-5 on in vitro and vivo digestibility in rats. **Animal Feed Sci. Technol.**, v. 70, p. 363-366, 1998.
- LAING, I. Cultivation of marine unicellular algae. **Lab. Leaf. Direct. Fish. Res.**, Lowestoft, v. 67, p.1-31, 1991.
- LEE, J. S. et al. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technol.**, v. 82, p. 1-4, 2002.
- LU, J.; TAKEUCHI, T.; SATOH, H. Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 238, p. 437-449, 2004.
- MASLOVA, I. P. et al. Lipid fatty acid composition and thermophilicity of cyanobacteria. **Russian J. Plant Physiol.**, v. 51, p. 353-360, 2004.
- MOLINA-GRIMA, E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol. Adv.**, v. 20, p. 491-515, 2003.
- MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2006.
- MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V., Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. LEB-18 and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **J. Biotechnol.** (2007): in press.
- OLGUÍN, E. et al. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthospira*) grown on digested pig waste. **Biores. Technol.**, v. 77, p. 19-24, 2001.
- QUEIROZ, M. L. S. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria Monocytogenes*. **Intern. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 889-900, 2003.
- RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214, 2002.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Black Well Science, 2004. 566p.

- 28.SAKAI, N. et al. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. **Energy Convers. Manage.**, v. 16, p. 693-696, 1995.
- 29.SANDER, A.B.T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 176-178, 2000.
- 30.SOEDER, C. J. An historical outline of applied algology. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 25-41.
- 31.SUKENIK, A.; WAHNON, R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition: I. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 97, p. 61-72, 1991.
- 32.SUNG, K. D. et al. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technol.**, v. 68, p. 269-273, 1999.
- 33.TAGUCHI, S.; HIRATA, J. A.; LAWS, E. A. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. **J. Phycol.**, v. 23, p. 260-267, 1987.
- 34.THOMPSON, P.A.; GUO, M. Effect of variation in temperature: I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **J. Phycol.**, v. 28, p. 481-488, 1992.
- 35.TSUZUKI, M. et al. Effects of CO₂ concentration during growth of fatty acid composition in microalgae. **Plant. Physiol.**, v. 93, p. 851-856, 1990.
- 36.WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. **J. Gen. Appl. Microbiol**, v. 6, p. 4, 1960.
- 37.WEN, Z. Y.; CHEN, F. Production potential of eicosapentanoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 218-224, 2000.
- 38.WILLIS, W. M.; LENCKI, R. E.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Crit. Rev. Food Sci.**, v. 38, p. 639-674, 1998.
- 39.YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ Fixation by *Chlorella* sp HA-1 and its utilization. **Energy Convers Manage.**, v. 36, p. 713-716, 1995.