

RENAN PAULO ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DE CEPAS DE MICROALGAS VERDES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R672c  
2015

Rocha, Renan Paulo, 1988-  
Caracterização metabólica de cepas de microalgas verdes /  
Renan Paulo Rocha. – Viçosa, MG, 2015.  
viii, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.33-45.

1. Algas marinhas. 2. Microalgas. 3. *Scenedesmus*.  
4. *Chlamydomonas*. 5. *Chlorella vulgaris*. 6. Metabolismos.  
7. Biocombustíveis. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação  
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 579.83


RENAN PAULO ROCHA

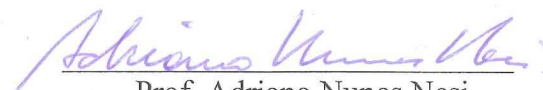
**CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DE CEPAS DE MICROALGAS VERDES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, para  
obtenção do título de *Máster Scientiae*

APROVADA: 19 de fevereiro de 2015.

  
Dr<sup>a</sup> Mariana Fonseca Machado

  
Prof. Wagner L. Araújo

  
Prof. Adriano Nunes Nesi  
(Orientador)

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”**

**(Charles Chaplin)**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pois não sou grande coisa, mas grandes coisas acontecem em minha vida porque Ele me guia.

Aos meus pais, meus amores, que sempre me apoiaram e muitas vezes, abriram mão do seu próprio conforto para poder me dar uma vida melhor. Por terem cultivado em mim, valores como caráter, respeito ao próximo, honestidade, perseverança e senso de justiça.

Aos meus irmãos, principalmente ao Rodolfo, que me ensinaram a dividir o pouco que temos, e a multiplicar o muito que somos, além de sempre acreditarem que eu sou capaz de vencer.

Aos meus sobrinhos, Bernardo, Noah e Victor, que me fazem querer ser cada dia melhor para ser o exemplo deles no futuro.

A minha cunhada querida, Bruna, pela torcida e o incentivo nas horas mais difíceis.

Ao meu amor, Carla Dias, pelo apoio e carinho, compreensão e conforto, pelo olhar de confiança e por toda dedicação à mim. Por me tornar parte de uma nova família maravilhosa que me recebe sempre de braços abertos.

Aos meus familiares, que acreditaram na minha capacidade e sempre oraram pelo meu sucesso.

Às amigas, Viviane e Nara, por desculparem minha ausência e por manterem viva nossa amizade através de todos esses anos.

Às amigas, Carla Quinhones e Cristiane Zorzatto, por todo apoio na hora do sufoco e por me mostrarem o valor de novas amizades.

À Professora Rosane Aguiar (in memoriam) por me ensinar a fazer tudo com alegria e determinação. Pela compreensão, afeto, orientação e amizade.

Ao Professor Adriano Nesi, por ter me dado a oportunidade de continuar trabalhando com as microalgas, pela orientação e por acreditar no meu potencial.

Ao Professor Thomas Willians e a Doutora Christina Vinson, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pelas instruções valiosas durante esses anos.

Ao Professor Marcio Aredes, pela generosidade e por deixar os equipamentos do Laboratório de Biodiesel à minha disposição.

Ao Rogério Gomide pelo suporte técnico e boa vontade.

A todos os meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, principalmente aos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo e da Unidade de Crescimento de Plantas, pelo riso, pela ajuda e por sempre me ajudarem nos momentos mais complicados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de me tornar um ser humano melhor, através do estudo.

E à FAPEMIG pela concessão da bolsa.

## **Biografia**

Renan Paulo Rocha, filho de Olavo Corrêa da Rocha Filho e Teresa Paulo Soares, nasceu em 15 de outubro de 1988, na cidade de Muriaé, Minas Gerais. Completou o ensino médio em sua cidade de nascimento, em 2006.

Formou-se Biólogo pela Universidade Federal de Viçosa, MG, em 2013. No mesmo ano, iniciou o Mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa.

## Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Introdução.....	1
Material e Métodos.....	5
Resultados.....	11
Discussão.....	25
Conclusão.....	32
Referência bibliográfica.....	33
Material Suplementar.....	45

## Resumo

ROCHA, Renan Paulo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Caracterização metabólica de cepas de microalgas verdes.** Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Microalgas têm atraído interesse como fonte potencial de matérias-primas para produção de biocombustíveis e de subprodutos de interesse (e.g., bioetanol e proteínas). Entretanto, a produção em escala comercial ainda é economicamente inviável, principalmente, pelo pouco conhecimento sobre a regulação do crescimento, a biossíntese e armazenamento de lipídios em microalgas. Neste estudo, avaliou-se o potencial de 10 cepas de algas coletadas na região de Viçosa – MG, com o objetivo de avaliar o crescimento e caracterizar o metabolismo em autotróficas de crescimento. Entre as cepas estudadas, duas cepas de *Scenedesmus* (BR003 e BR024) apresentaram os maiores valores para produtividade de biomassa, que associado a quantidades intermediárias de lipídios garantiram uma alta produtividade de lipídios em relação às outras cepas. Essas duas cepas também se destacaram entre as demais em relação ao perfil de ácido graxo, apresentando altos teores dos ácidos graxos C16:0 e C18:1 e baixos teores dos poliinsaturados. No entanto, o perfil graxo das cepas *Chlamydomonas* sp. BR020 e *Chlorella vulgaris* BR017 apresentou altos teores de ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3) e esta cepa também apresentou maiores teores de proteínas, constituindo-se em importantes cepas para o conceito de biorefinária. Verificou-se também que a maioria dos metabólitos (aminoácidos e ácidos orgânicos) avaliados apresentaram correlação negativa com a biomassa produzida e positiva com o conteúdo de lipídios. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que a baixa produção de biomassa está relacionada com acúmulo de aminoácidos (isoleucina, leucina e valina), intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (citrato, succinato e fumarato), que frequentemente estão associados com acúmulo de óleo na célula. Entretanto, apesar da proximidade filogenética de algumas cepas em termos de gênero ou espécie, algumas cepas apresentaram comportamentos distintos o que não permitiu o agrupamento das mesmas, demonstrando, portanto, a necessidade de uma caracterização mais detalhada desses organismos.

## Abstract

ROCHA, Renan Paulo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Metabolic characterization of green microalgae strains.** Advisor: Adriano Nunes Nesi.

Microalgae have attracted interest as a potential source of raw materials for biofuels and by-products of interest such as bioethanol and protein. However, the production on a commercial scale is still costly mainly by little knowledge about the regulation of growth, biosynthesis and lipid storage in microalgae. In this study, we evaluated the potential of 10 strains of algae collected in Viçosa region - MG, with the aim of evaluating the growth and characterize the metabolism in autotrophic conditions. Among the studied strains, two strains of *Scenedesmus* (BR003 and BR024) had the highest values for biomass productivity, which associated with intermediate amounts of lipids guaranteed high productivity of lipids compared to other strains. In addition these two strains differed among the others in relation to the fatty acid profile, with high levels of C16 and C18: 1 fatty acids and low levels of the polyunsaturated fatty acids. However, the fatty acid profile of *Chlamydomonas* sp., BR020, and *Chlorella vulgaris*, BR017, showed high levels of  $\alpha$ -linolenic acid (C18: 3) and this strain also exhibited higher protein levels, suggesting that these are important strains for the biorefinery concept. It was also observed that most of the evaluated metabolites (amino acids and organic acids) were negatively correlated with biomass and positively with lipid contents. Taken together, these results indicate that low biomass production is related to the levels of amino acids (isoleucine, leucine and valine), intermediates of the tricarboxylic acid cycle (citrate, succinate and fumarate), which are often associated with oil accumulation in the cell. However, despite the phylogenetic proximity in terms of genus or species showed, some of the strains displayed differential behavior which did not allow grouping of the strain in the same cluster, thus indicating the need for a deeper characterization of these organisms.

## **1. Introdução**

A sociedade humana tem uma alta demanda por combustíveis que são provenientes principalmente de reservas de petróleo (Parmar et al., 2011). Registra-se que a queima de combustíveis fósseis é considerada uma das principais fontes de gases responsáveis pelo aquecimento global. Assim, acredita-se que, de acordo com as taxas de consumo de combustível, as reservas fósseis de petróleo serão exauridas em menos de 50 anos (Rodolfi et al., 2009).

Neste contexto, o biodiesel, combustível derivado de materiais vegetais, tem recebido grande atenção (Scott et al., 2010). Entre as fontes vegetais de óleos de grande importância destaque tem sido dado a oleaginosas como pinhão manso, dendê e macaúba (Couto et al., 2007). Contudo, a produção de tais oleaginosas não é capaz de suprir a demanda de óleo para a produção de biodiesel (PNPB, 2009). Para atingir tal objetivo é necessária uma expansão significativa das áreas de cultivo dessas culturas no país. Entretanto, esta expansão na área de produção ocasionaria um aumento no desmatamento de florestas nativas e aumento dos preços dos alimentos (Khan et al., 2009). Assim, acredita-se que microalgas, utilizadas como fontes de biomassa, poderiam suprir as demandas por óleo para atender a produção de biodiesel (Chisti, 2007). Isto se deve ao fato de que a produção de biodiesel a partir de microalgas pode ser 10 a 20 vezes superior à produção de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (Gouveia & Oliveira, 2009).

Microalgas são micro-organismos eucarióticos, fotossintéticos, que possuem clorofila a como pigmento fotossintético primário, capazes de converter luz solar, água e dióxido de carbono em biomassa (Chisti, 2008). O potencial de tais organismos para produção de biodiesel é atualmente reconhecido,

principalmente devido à alta eficiência fotossintética e ao rápido crescimento em relação às plantas (Rodolfi et al., 2009; Mandal & Mallick, 2009). Tais organismos fazem parte de um grupo grande e diverso de que podem existir na forma unicelular, filamentosa ou de colônias, além de serem encontrados em vários habitats (Kumar et al., 2010).

Apesar do potencial claro, é importante mencionar que embora a produção de biocombustíveis a partir de microalgas seja tecnicamente viável a sua utilização comercial não é ainda economicamente sustentável devido aos custos elevados para produção em larga escala (Chisti, 2007). Para tornar o biodiesel de microalgas competitivo frente ao combustível de petróleo, são necessárias estratégias capazes de reduzir custos produção e aumentar a produtividade lipídica e de biomassa (Scott et al., 2010).

Para a escolha e utilização de uma cepa de microalga são utilizados como critérios de seleção alta produção de biomassa em curto intervalo de tempo e alta produtividade de lípidos (Griffiths et al., 2009; Wang & Lan, 2011). Assim, em relação ao teor de óleo algumas espécies podem produzir grandes quantidades, atingindo de 50 a 60% do seu peso seco (Sheehan et al., 1998). Não obstante, valores acima de 40% são frequentemente encontrados em condições de limitação nutricional (Rodolfi et al., 2009).

Dentre as espécies de microalgas já estudadas, algumas apresentam alto conteúdo lipídico e potencialmente podem servir como uma fonte viável de produção de óleo, tais como *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Chlorella* sp., *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Botryococcus braunii* e *Scenedesmus* sp. (Larkum et al., 2011; Tang et al., 2011). Apesar de essas cepas terem sido selecionadas em um grande pool de espécies, a diversidade de algas foi

ainda pouco explorada (Larkum et al., 2011). Os lipídios de microalgas, assim como os de origem vegetal, são compostos por lipídios polares e neutros, que consistem de triacilgliceróis (TAG) e éster, principalmente na forma de TAG. Sob condições favoráveis, microalgas sintetizam principalmente lipídios polares (e.g., glicolipídios e fosfolipídios) que são constituintes das membranas dos cloroplastos e dos sistemas de membrana celular. Contudo, sob condições desfavoráveis ao crescimento celular, como estresses nutricionais, microalgas acumulam lipídios neutros na forma de gotículas lipídicas localizadas no citoplasma (Sheehan et al., 1998; Illman et al., 2000; Converti et al., 2009; Lv et al., 2010; Li et al., 2011; Feng et al. 2011; Deng et al., 2011). Todavia, a produção de lipídios neutros a partir de microalgas atualmente tem resultado em produções muito abaixo do rendimento máximo teórico (Li et al., 2011). Não obstante, um maior conhecimento em relação às vias metabólicas e a regulação das mesmas pode permitir a elaboração de estratégias que promovam um aumento na produção de lipídios (Li et al., 2011).

O grupo das algas é bastante divergente, pois é derivado de múltiplos eventos de endossimbiose. Esse fato reflete-se diretamente na diversidade em relação ao metabolismo central entre as espécies de algas, tais como acúmulo de diferentes formas de polissacarídeos de reservas (Lee, 2008). Entretanto, em relação a plantas e outros organismos, pouco é conhecido sobre o metabolismo de microalgas. Sendo assim, a compreensão das vias metabólicas e sua regulação é de fundamental importância para compreender a sua fisiologia (Yang et al., 2000). Além disso, este conhecimento é fundamental para trabalhos de engenharia metabólica e a utilização industrial das microalgas (Obata et al., 2013).

Em geral, sob condições desfavoráveis ao crescimento o carbono fixado pode ser direcionado para síntese de compostos de reserva, como por exemplo, amido e lipídios, que podem fornecer energia e esqueletos de carbono para o crescimento e desenvolvimento celular (Recht et al., 2014). O acúmulo dessas reservas em microalgas é determinado pelas condições de cultivo e verifica-se que condições que reduzem o crescimento celular e induzem alterações no metabolismo aumentando o acúmulo de reservas (Hu et al., 2008 ; Fan et al., 2012). Assim, a inibição do crescimento pode gerar uma resposta de direcionamento parcial do metabolismo para a produção de compostos de carbonos reduzidos, resultando em aumentos do rendimento em processos de produção de biocombustíveis (Caldana et al. 2013).

A síntese de compostos de reservas está também relacionada com os níveis de outros metabólitos, como por exemplo, os carotenóides (Recht et al., 2014). Em adição, o acúmulo de ácidos graxos frequentemente ocorre quando há um acréscimo nos níveis dos intermediários do ciclo TCA. Estes aumentos são observados em decorrência do acúmulo de esqueletos de carbono e poder redutor utilizado na biossíntese de lipídios (Recht et al., 2014; Fan et al., 2012). No entanto, pouco se conhece sobre como estes fatores metabólicos estão associados com a produção de biomassa e lipídios em diferentes cepas de microalgas (Lu et al., 2012).

Diante desses fatos, faz-se necessário uma melhor compreensão da regulação do metabolismo e seus efeitos na fisiologia destes organismos. Além disso, faz-se necessário o isolamento e seleção de cepas de microalgas com potencial para a produção de lipídios e geração de biomassa. Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar cepas de microalgas verdes, caracterizar a sua

fisiologia e o metabolismo visando fornecer informações importantes para serem aplicadas em pesquisas futuras para a viabilização do cultivo.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Seleção, sequenciamento e identificação molecular de cepas de microalgas**

As espécies foram coletadas em diferentes corpos d'água da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, utilizando-se copo coletor e/ou rede de fitoplâncton com abertura de malha de 20  $\mu\text{m}$  (Bicudo & Menezes, 2005).

Os materiais coletados foram acondicionados em frascos de vidro de boca larga (500 mL) hermeticamente fechados e previamente esterilizados em autoclave a 1,5 atm e 121 °C por 20 minutos, utilizando cerca de 60 % do volume total do recipiente.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Ficologia, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), do Departamento de Biologia Vegetal – UFV, submetidas ao enriquecimento (Kugrens et al., 2000) e cultivadas em meio *Bold's Basal Medium* (BBM), pH 6,6 (Andersen et al., 2005).

O isolamento das cepas foi realizado utilizando-se diferentes metodologias: micropipetagem em meio líquido e diluição seriada (Aguiar, 2000), com a finalidade de se obter culturas monoespecíficas. As culturas foram mantidas em sala de cultivo, sob condições fotoautotróficas de crescimento, ou seja, a temperatura de  $24 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro, irradiância média de 60  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40 W, visando obtenção de inóculos suficientes para os experimentos posteriores.

Características morfológicas, diacríticas, foram utilizadas para identificação do material a partir de chaves de identificação propostas em literaturas específicas (Bicudo e Menezes, 2005). A identificação em nível de gênero foi feita usando medidas de células com auxílio do programa Axio Vision 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, Alemanha) a partir de registros fotográficos obtidos em microscópio AX70 (Olympus, Japão).

Além da identificação morfológica por meio de chave de identificação foi realizada a identificação molecular das cepas. Para tal, foi realizada extração de DNA de cultivos unialgais não axênicos, utilizando método de CTAB (Doyle & Doyle 1987). Para identificação molecular foram utilizadas três regiões nucleares, ITS (Internal Transcribed Spacer) que foi amplificada utilizando os primers descrito por White et al. (1990), forward (5' - CGAATTCAACCTGGTTGATCCTGCCAGT - 3') e reverse (5' - GTCCACTGAACCTTATCATTTAG - 3'). Para a região do 18SrRNA foram utilizados primers universais conforme relatado por Ratha et al. (2012), forward (5' - CGAATTCAACCTGGTTGATCCTGCCAGT - 3') e reverse (5' - CCGGATCCTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC - 3') e a região da subunidade menor do ribossomo (LSUD2D3) que foi amplificada com os primers forward (5' - AMAAGTACCRYGAGGGAAAG - 3') e reverse (5' - SCWCTAATCATTCGCTTTACC - 3') (Hamsher et al., 2011). A reação em cadeia da polimerase (PCR) consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos e então 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos; anelamento à 45 °C por 45 segundos e alongamento a 70°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos. Os produtos foram visualizados em gel agarose 1,5 %, segundo Hamsher et al. (2011).

Os produtos da reação de amplificação foram purificados, utilizando-se EXOSAP-IT e o sequenciamento utilizando os serviços da Macrogen (Coréia). As sequências obtidas foram importadas para o aplicativo SEQUENCHER 4.8 (Genes CodeCorp.) e a edição conduzida com correções manuais. As identidades moleculares foram determinadas pela comparação com sequências de DNA de cada gênero disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (National Center for Biotechnology Information – NCBI) utilizando alinhamento local (BLAST) (Ki et al., 2009).

## **2.2. Curvas de crescimento**

Foram realizadas curvas de crescimento para caracterização do crescimento das diferentes cepas. Para montagem das curvas de crescimento foram utilizados inóculos na concentração de  $1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. Os cultivos foram realizado sem condições fotoautotróficas de crescimento, a temperatura de  $24 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro, irradiância média de 120  $\mu$ mol fótoms m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40 W, em meio BG 11, como meio de cultura e o pH 7,5 (Andersen et al., 2005).

Os cultivos foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyers de 125 mL com volume útil de 65 mL (25 % de inoculo v v<sup>-1</sup>), sob agitação de  $110 \pm 1$  rpm. As curvas tiveram duração de 15 a 20 dias. As taxas de crescimento foram obtidas por meio de contagem de células em câmara de Neubauer a partir de amostragens realizadas de dois em dois dias durante o cultivo (Wood et al., 2005).

## **2.3. Determinação de massa seca**

A determinação de biomassa foi realizada conforme Griffiths e colaboradores (2011a). Foram coletados ao término do experimento 10 mL de

cultura e filtrados em membrana de celulose com porosidade de 45  $\mu\text{m}$  (Milipore), previamente secas e pesadas. Para eliminar o peso dos meios um volume equivalente de meio esterilizado foi pesado. Após a filtração as membranas foram secas em estufa à 75 °C e pesados até a obtenção de peso constante.

#### **2.4.Extração e quantificação de pigmentos**

Para a extração de pigmentos foi coletado 1mL de cultura, ao término do período de cultivo (fase estacionária), e centrifugados a 11000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e realizada uma lavagem do pellet com mesmo volume de água deionizada, e centrifugado novamente. O material obtido foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80 °C até a extração. As quantificações de clorofila a e b e carotenóides totais foram realizadas segundo extração de Griffiths e colaboradores (2011b), substituído-se o dimetilsulfóxido (DMSO) por metanol. A absorbância foi determinada a 665, 652 e 470nm em um leitor de microplacas (UVM 340, AsysHitech). Para cálculo da concentração de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais foram utilizadas as equações propostas por Wellburn (1994).

#### **2.5.Extração e quantificação de proteínas hidrossolúveis**

A extração de proteínas hidrossolúveis totais foi realizada conforme Meijer & Wijffels (1998), utilizando 2mL do cultivo na fase estacionária coletados como descrito no item anterior,. A quantificação foi realizada pelo método de Lowry adaptado por Lucarini & Kilikian (1999). A absorbância foi determinada a 750 nm em um leitor de microplacas (UVM 340, AsysHitech), utilizando a albumina do soro bovino como padrão, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de

proteínas hidrossolúveis totais mL<sup>-1</sup> de cultivo.

## **2.6. Determinação de carboidratos neutros**

Para quantificação de carboidratos neutros foram utilizados 2mL da cultura coletados no final do período do cultivo. A extração de carboidratos intracelulares foi realizado conforme proposto por Teoh et al. (2004), substituindo-se o HCl por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A quantificação foi realizada pelo método de Dubois adaptado por Masuko e colaboradores (2005), utilizando glicose como padrão. A absorbância foi determinada a 490 nm em leitora de microplacas (UVM 340, AsysHitech).

## **2.7. Determinação de açúcares, amido e aminoácidos totais.**

Foram coletados 2mL das culturas e submetidas à extração etanólica à quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Gibon et al., 2004) e, na fração insolúvel, os teores de amido (Fernie et al., 2001).

## **2.8. Determinação de lipídios totais**

Para extração de lipídios foram coletados 45mL de cultura na fase estacionária e centrifugados a 11000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e realizada uma lavagem do pellet com mesmo volume de água deionizada, e centrifugado novamente. O material obtido foi congelado em nitrogênio líquido, armazenado em freezer a -80 °C e posteriormente liofilizados (Liofilizador: Scanvac, Coolsafe 55-4). Os lipídios totais foram extraídos utilizando 20 mg de biomassa liofilizada conforme o método de Bligh e Dyer

(1959) adaptado por Wang e colaboradores(2010). A fase orgânica (clorofórmio) foi coletada e seca em estufa a 50 °C, e posteriormente pesada para quantificação dos lipídios totais.

## **2.9.Determinação do perfil de ácidos graxos**

Foram utilizadas 10 mg de culturas liofilizadas para extração e derivatização dos ácidos graxos baseado no método descrito por Laurens e colaboradores (2012). Os ésteres etílicos de ácidos graxos (FAMES) foram analisados usando um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010) equipado com uma coluna HT-5 (25 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm filmthickness) (SGE, Texas, USA). Foi injetado 1 µL da amostra no modo direto com temperatura de 270 °C, 3 mL min<sup>-1</sup> de fluxo de purga e fluxo inicial da coluna de 6,57 ml min<sup>-1</sup> (85,7 cm seg<sup>-1</sup>, com pressão constante) com He como gás de arraste. A temperatura do forno foi mantida constante a 80 °C por 3 minutos, aumentando 12 °C por min<sup>-1</sup> até alcançar 330 °C e então mantida por 2 min. A detecção foi feita usando um detector de chama ionizante (FID) e a quantificação absoluta de FAMES utilizando uma curva padrão baseada na resposta média dos FAMES C16, C18, C20, C22 e C24, em concentrações entre 0.008 µgml<sup>-1</sup> e 0.8 mgml<sup>-1</sup>, e expressada como porcentagem de massa seca utilizada para a extração.

## **2.10. Determinação do perfil metabólico**

Foi coletado 1mL da cultura na fase estacionária no meio do período luminoso em 1 mL de metanol 70% (v/v) gelado e centrifugados a 11000 rpm por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80 °C. Posteriormente os metabólitos foram

extraídos em uma mistura contendo metanol, água e clorofórmio (10:3:1) e adicionado ribitol como padrão interno (Lisec et al., 2006), e usadas para determinação do perfil metabólico, por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM). Os cromatogramas gerados pelo CG-EM foram exportados do programa Leco ChromaTof (versão 3.25) para o programa R. A identificação e quantificação dos metabólitos foi realizada conforme Cuadros-Inostroza et al. (2009). Os valores relativos de cada metabólito foram calculados dividindo a intensidade do pico referente ao metabólito pela intensidade do pico do padrão interno (Ribitol). O resultado foi dividido pela biomassa de cada amostra e então dividido pela média do metabólito em todas as amostras.

### **2.11. Delineamento experimental e estatística**

Os experimentos foram montados em Delineamento Inteiramente Casualizado com quatro repetições. Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância. A ANOVA e o teste de Tukey foram executados utilizando o software SigmaPlot (versão 11.0, Systat Software).

Os dados também foram submetidos a análise de correlação de Pearson utilizando programa GENES(Cruz, 2007) e a análise multivariada, componentes principais e de agrupamento, com o software MINITAB(versão 16.1, Software ).

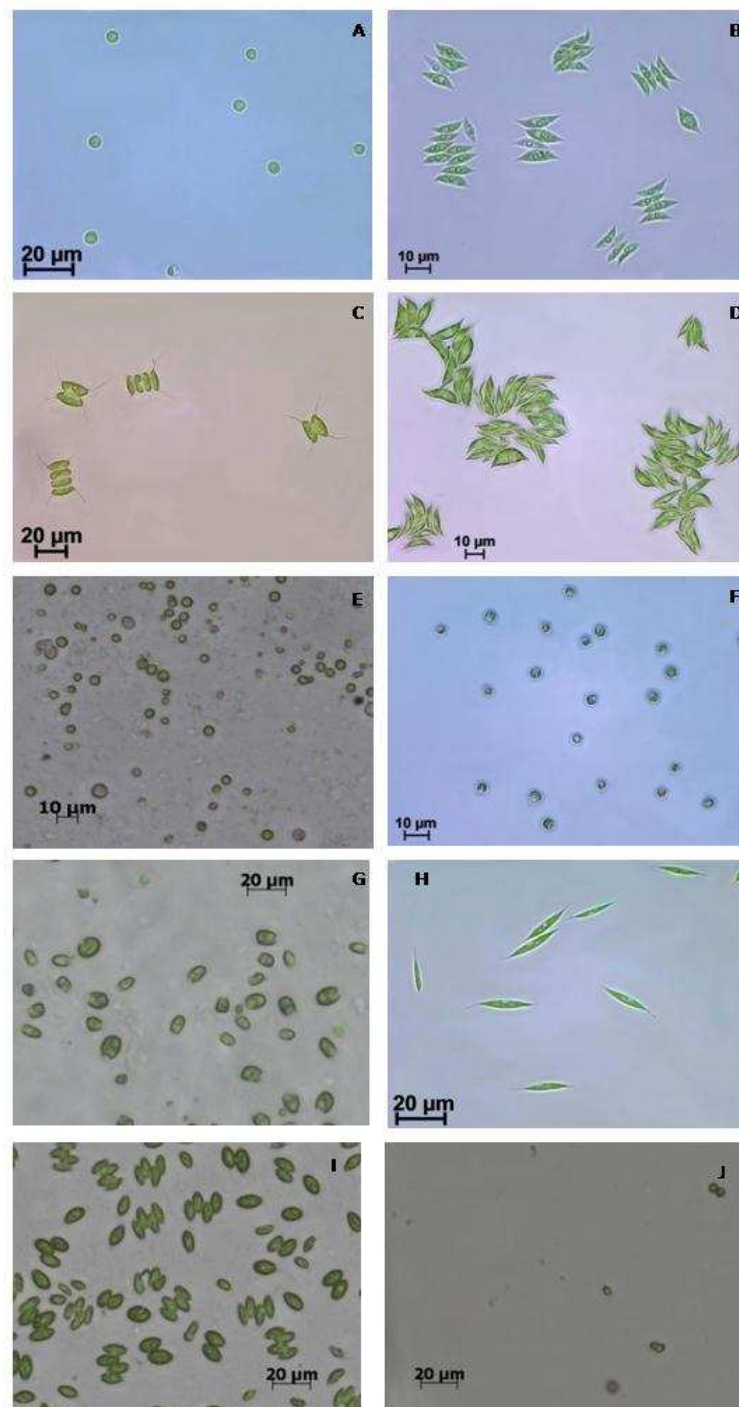
### 3. Resultados

#### 3.1. Identificação molecular

Dados morfológicos são normalmente pouco precisos quando usados para identificar espécies de microalgas, sendo necessário, portanto, a identificação molecular. Para a identificação molecular das cepas utilizadas neste trabalho foram utilizadas três regiões genômicas. Destas a região correspondente ao gene da subunidade menor do ribossomo (LSUD2D3) não se mostrou uma região relevante para as análises, provavelmente devido à falta de sequências das espécies depositadas no NCBI. Assim, para a identificação molecular foram utilizadas apenas as regiões correspondentes ao 18S e ao ITS. A análise comparativa das sequências de DNA obtidas permitiu que as cepas utilizadas neste estudo fossem identificadas correspondendo a sete diferentes gêneros de microalgas verdes (Figuras 1 e 2). Foram identificadas duas espécies de *Scenedesmus*, (BR003S. *obliquus* e BR024S. *bajacalifornicus*), três de *Chlorella*, (BR001 *C. sorokiniana* e, FURG *C. sorokiniana* e e BR017 *C. vulgaris*) uma espécie de *Selenastrum* (BR009 *S. capricornutum*), uma de *Desmodesmus* (BR007 *D. communis*), um *Monoraphidium* (BR023 *Monoraphidium* sp) uma *Chlamydomonas* (BR020 *Chlamydomonas* sp) e uma de *Pectinodesmus* (BR019 *P. pectinatus*; Tabela 1).

De maneira geral a identificação taxonômica à nível de gênero foi bastante similar à identificação molecular. Entretanto, as cepas BR019 e BR009, que foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Chlorella* e à *Ankistrodesmus*, na realidade pertencem aos gêneros *Pectinodesmus* e *Selenastrum* respectivamente. Contudo, em nível de espécie a identificação morfológica não correspondeu à

molecular, demonstrando, portanto a importância dos dados moleculares na identificação precisa de microalgas.



**Figura 1.** Diferentes padrões morfológicos entre as 10 cepas de microalgas analisadas. A –C. sorokiniana BR001, B –S. obliquusBR003, C –D. communisBR007, D - S. capricornutumBR009, E - .C vulgarisBR017, F –P. pectinatusBR019, G –C. sp. BR020, H –M. sp. BR023, I – S. bajacalifornicus BR024, J – C. sorokiniana FURG

**Tabela 1.** Comparação entre a identificação morfológica e a molecular utilizando o primeiro Hit do BLAST no NCBI para as regiões do 18S e ITS das 10 cepas de microalgas estudadas

<b>Cepa</b>	<b>Identificação morfológica</b>	<b>Identificação molecular (1° Hit)</b>	<b>Identidade 18S</b>	<b>Acesso NCBI</b>	<b>Identidade ITS</b>	<b>Acesso NCBI</b>
<b>BR001</b>	Chlorellavulgaris	Chlorellasorokiniana	1677/1687 (99%)	AB731602.1	674/675 (99%)	KJ676113.1
<b>BR003</b>	Scenedesmusacuminatus	Scenedesmusobliquus	-	-	628/642 (98%)	JQ082318.1
<b>BR007</b>	Desmodesmusquadricauda	Desmodesmuscommunis	-	-	585/593 (99%)	JQ922412.1
<b>BR009</b>	Ankistrodesmusbibraianus	Selenastrumcapricornutum	907/908 (99%)	JQ315794.1	651/661 (98%)	JQ315794.1
<b>BR017</b>	Chlorellacf. protothecoides	Chlorellavulgaris	585/585 (100%)	AB237642.1	724/724 (100%)	FM205853.1
<b>BR019</b>	Chlorellasarcophylla	Pectinodesmuspectinatus	848/848 (100%)	AB917099.1	620/636 (97%)	JQ082334.1
<b>BR020</b>	Chlamydomonasp.	Chlamydomonasp.	1673/1685 (99%)	KC149966.1	447/513 (87%)	JX911252.1
<b>BR023</b>	Monoraphidiumirregulare	Monoraphidiumsp.	1046/1048 (99%)	JQ809706.1	-	-
<b>BR024</b>	Scenedesmusobliquus	Scenedesmusbajacalifornicus	1673/1688 (99%)	HQ246322.1	627/629 (99%)	JX456466.1
<b>FURG</b>	Chlorellasp.	Chlorellasorokiniana	-	-	749/755 (99%)	KJ676113.1

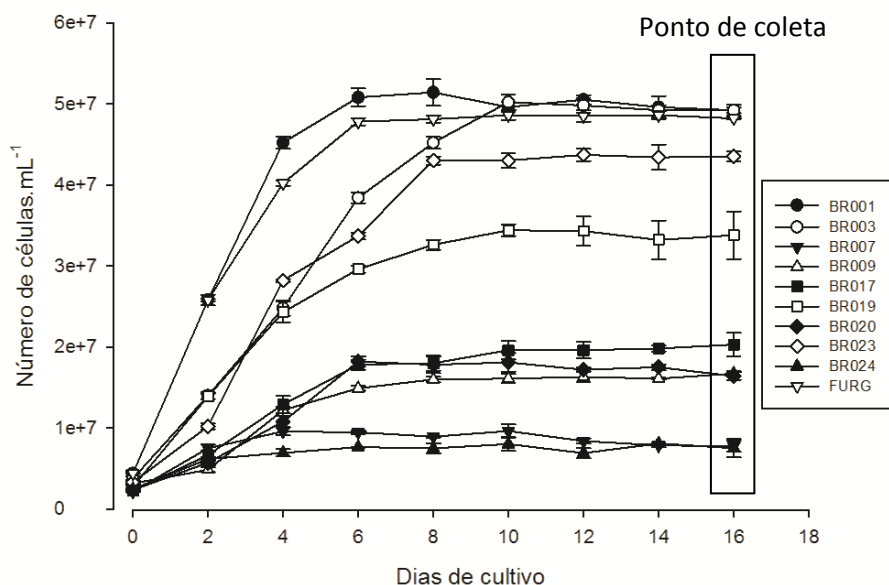
### **3.2. Determinação de biomassa e produtividade das cepas analisadas**

Para caracterizar as diferentes cepas e identificar as estirpes com potencial para produção de lipídios e biomassa foram realizados estudos de crescimento e análise da composição de biomassa. Todas as cepas avaliadas apresentaram uma fase de adaptação, ou fase lag, curta e uma fase log variando de 4 a 6 dias de cultivos, ao passo que a fase estacionária correspondeu a maior parte do cultivo. As cepas BR001, BR003 e FURG apresentaram as maiores taxas de crescimento e alcançaram os maiores números de células na fase estacionária, enquanto as cepas BR007 e BR024 obtiveram os menores valores para o número de células (Figura 3).

As maiores produtividade de biomassa, diferentemente do número de células, foram obtidas para as duas cepas de *Scenedesmus* (BR003 e BR024) e a cepa BR007. Por outro lado, o menor rendimento foi obtido na cepa BR023 (Figura 4A).

### **3.3. Metabolismo do carbono**

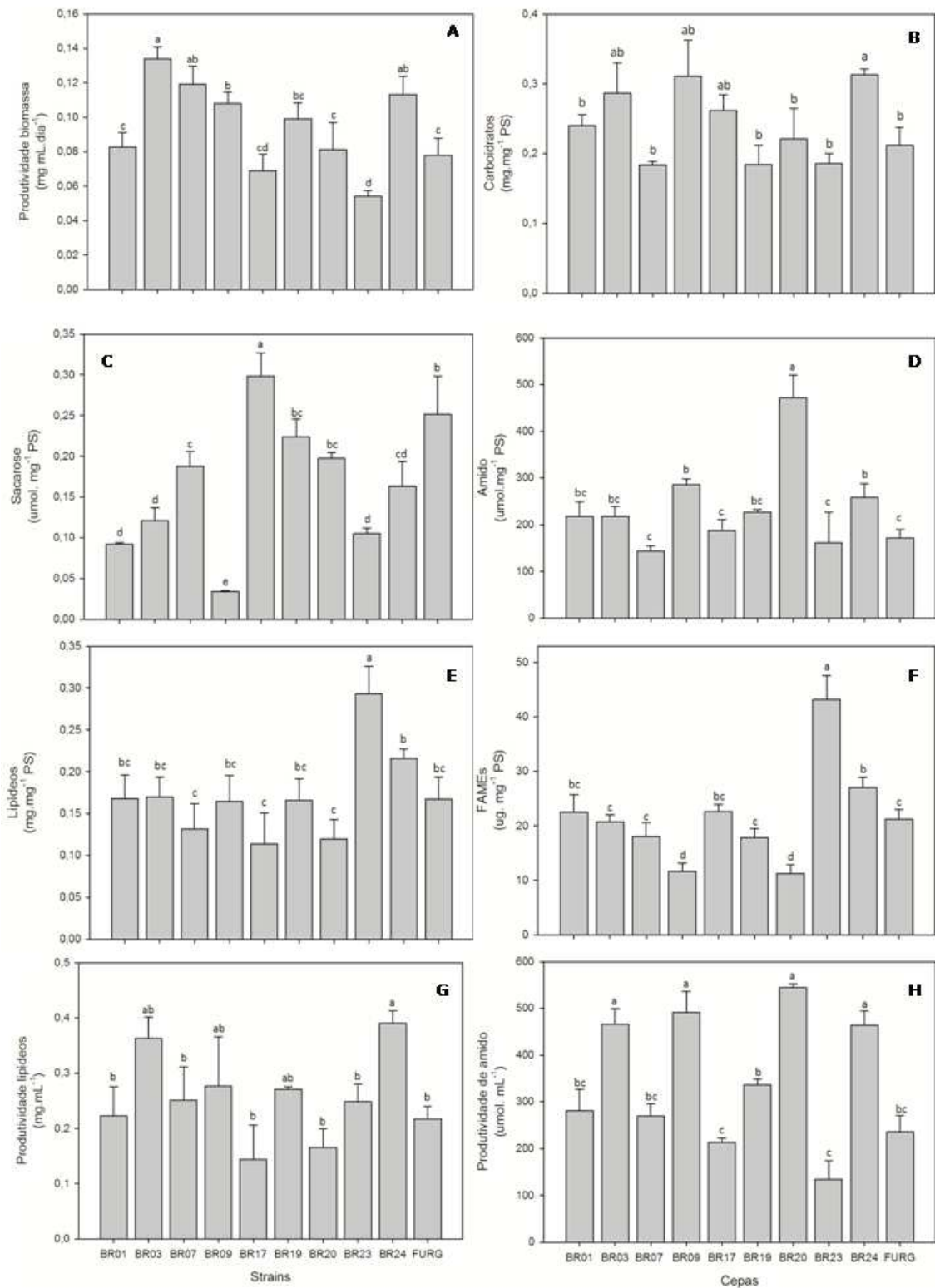
Os maiores níveis de carboidratos totais foram encontrados nas estirpes de *Scenedesmus* BR024 e BR003, além da cepa BR009 (Figura 4B). Contudo, tal padrão não foi observado para os teores de sacarose, no qual a cepa BR001 apresentou o maior valor, enquanto a cepa BR009, embora tenha apresentado altos valores de carboidratos solúveis totais, apresentou o menor valor entre as cepas (Figura 4C).



**Figura 2.** Curva de crescimento baseado na contagem de células para as dez cepas analisadas. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

Os maiores teores de amido foram encontrados na cepa BR020 e os menores foram observadas nas cepas BR007, BR017, BR023 e FURG (Figura 4D). Contrariamente aos teores de amido, a cepa BR020 apresentou um dos menores teores de lipídios, juntamente com as cepas BR017 e BR007. Por outro lado, o maior valor obtido foi encontrado para a cepa BR023 (Figura 4E). De maneira semelhante, as maiores concentrações de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAMES) foram encontradas na cepa BR023, enquanto os menores níveis foram obtidos nas cepas BR020 e BR009 (Figura 4F).

Em relação à composição de ácidos graxos não se observaram variações marcantes entre as diferentes cepas de microalgas (Tabela 2). A maior parte dos ácidos graxos das estirpes analisadas são cadeias compostas de 16 carbonos (C16:0, 16:1, 16:2 e 16:3) e 18 carbonos (C18:0, 18:1, 18:2 e 18:3). Quando somados, cadeias com 16 e 18



**Figura 4.** Produtividade de biomassa e metabolismo do carbono nas 10 cepas de microalga estudadas. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão (n=4). Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% ( $P \leq 0,05$ )

carbonos constituem mais de 70% dos ácidos graxos analisados em todas as cepas avaliadas (Tabela 2). Todavia, destaca-se as cepas BR020 e BR017 que apresentaram altos teores de ácidos graxos poliinsaturados.

Baseado na produtividade de biomassa e conteúdo lipídico as cepas que apresentaram maior produtividade de lipídios foram BR024, seguida por BR003 (Figura 4G). Embora estas cepas não tenham apresentado os maiores teores de lipídio, os altos valores de produtividade de biomassa seca somados a teores consideráveis de lipídios foram responsáveis pela alta produtividade, uma vez que a produtividade de biomassa foi o principal fator responsável na produtividade de lipídios (Figura 7).

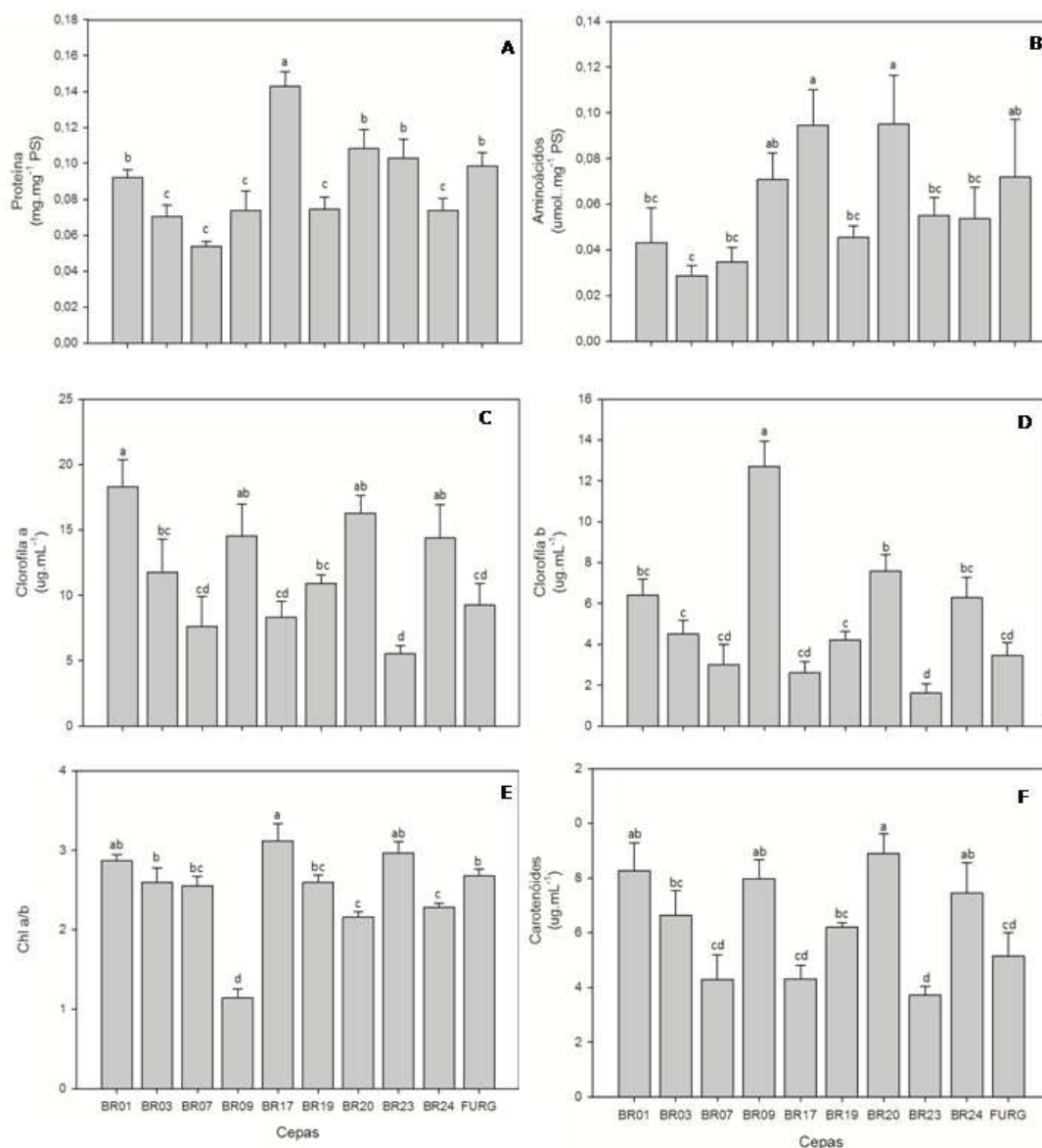
### **3.4. Metabolismo do nitrogênio**

As maiores concentrações de proteína foram encontradas para BR017, enquanto as menores foram encontradas para as cepas BR007 e BR003 (Figura 5A). Para aminoácidos totais as maiores concentrações foram obtidas para as cepas BR017 e BR020, e o menor encontrado para a cepa BR003 (Figura 5B), semelhante ao padrão observado para proteínas solúveis totais.

Na quantificação dos pigmentos foram obtidos padrões diferentes entre as diferentes estirpes. Assim, para clorofila a os maiores níveis foram observados em BR001 (Figura 5C). Já para clorofila b a cepa que apresentou maior concentração foi BR009 (Figura 5D), que foi responsável pelo menor valor da razão clorofila a/b ( $1,14 \pm 0,12$ ) apresentado por esta cepa, única a apresentar razão inferior a 1,5 (Figura 5E). A maior concentração de carotenóides totais foi encontrada na cepa BR020 (Figura 5F) e por outro lado a cepa BR023 foi a que apresentou menor conteúdo de todos os três pigmentos avaliados e, conseqüentemente, menor valor de pigmentos totais.

**Tabela 2.**FAMEs das cepas analisadas. Os valores são expressos como porcentagem da área total de FAMEs na cromatograma. Somente FAMEs com número par de carbonos, e com uma abundância >0,5% em pelo menos uma das cepas estão ilustrados.

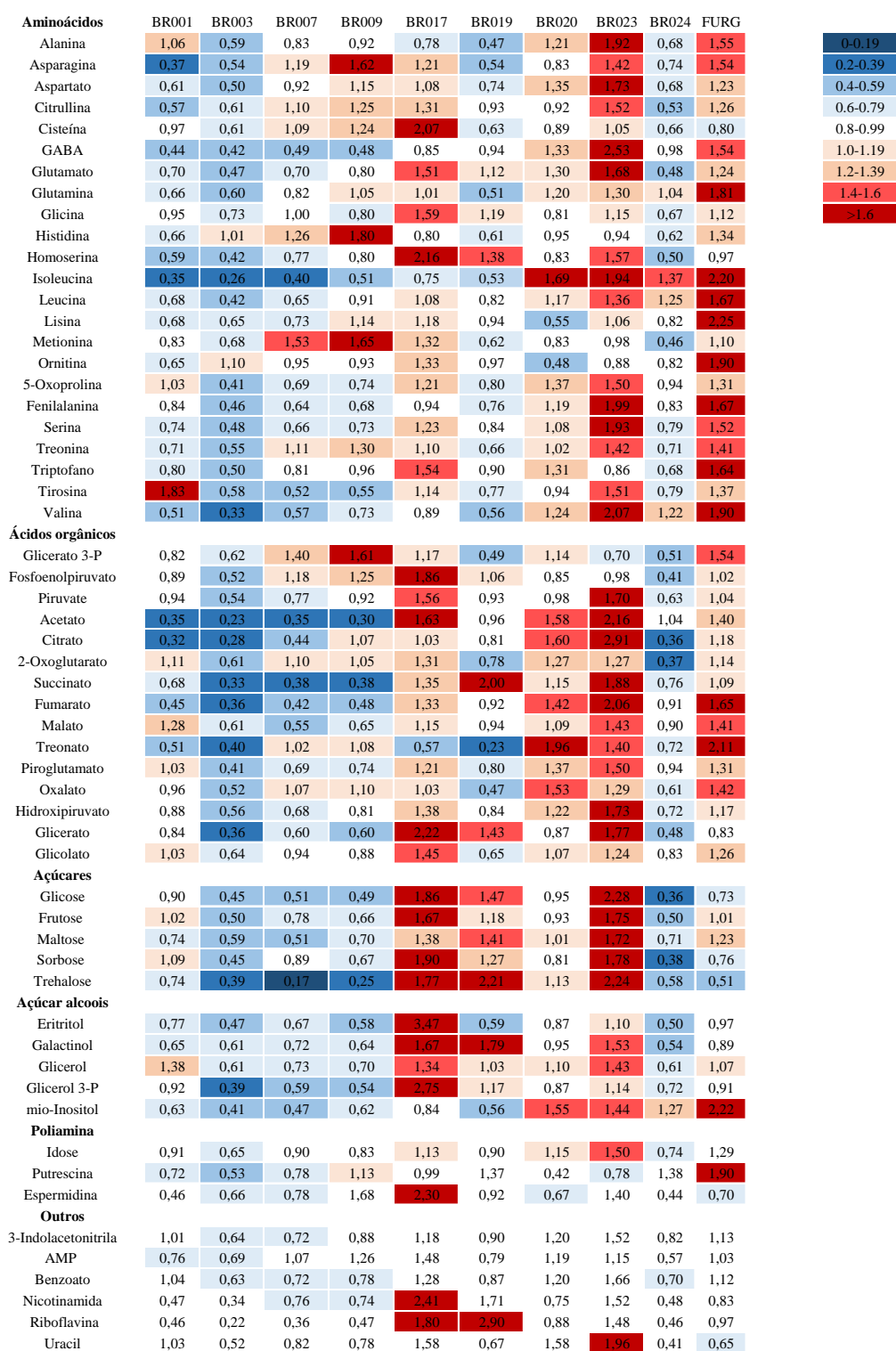
FAME	BR001	BR003	BR007	BR009	BR017	BR019	BR020	BR023	BR024	FURG
C12:0	1,7±0,3	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	0,7 ± 0,06	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,04
C14:0	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,04	4,1 ± 0,3	1,3 ± 0,8	0,4 ± 0,03	1,2 ± 0,7	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,03	1,4 ± 0,1
C14:1	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,09	0,9 ± 0,1	2,19 ± 1,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,09
C16:0	42,3 ± 2,2	47,9 ± 4,4	29,1 ± 2,7	35,7 ± 0,9	21,3 ± 1,8	24,0 ± 2,1	31,3 ± 2,6	31,5 ± 0,7	36,1 ± 2,5	32,4 ± 1,2
C16:1	5,9 ± 1,0	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0,4	0,9 ± 0,01	1,1 ± 0,2	3,0 ± 0,1
C16:2	6,9 ± 1,1	1,8 ± 0,7	1,1 ± 0,4	0,8 ± 0,1	5,8 ± 1,3	2,7 ± 0,1	2,0 ± 0,9	2,5 ± 0,6	0,1 ± 0,03	1,1 ± 0,4
C16:3	4,8 ± 1,0	3,5 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,0 ± 0,2	3,3 ± 1,0	1,0 ± 0,2	3,7 ± 0,7	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3
C18:0	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,6	3,55 ± 0,6	1,8 ± 0,6	0,7 ± 0,1	2,1 ± 0,5	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,5	3,1 ± 0,1	4,3 ± 0,2
C18:1	28,2 ± 2,5	34,1 ± 5,8	42,8 ± 3,5	33,4 ± 3,2	27,6 ± 2,8	36,2 ± 2,9	21,8 ± 2,6	46,3 ± 1,5	39,9 ± 2,2	30,0 ± 2,3
C18:2	39,2 ± 1,3	13,0 ± 2,0	4,2 ± 1,4	4,4 ± 1,4	17,5 ± 1,2	15,4 ± 1,5	4,7 ± 2,7	7,2 ± 0,3	3,4 ± 0,8	14,8 ± 2,1
C18:3	10,9 ± 0,4	7,7 ± 1,0	7,4 ± 1,9	0,4 ± 0,1	15,8 ± 1,0	10,2 ± 1,5	21,8 ± 1,7	6,6 ± 0,5	11,2 ± 1,9	8,1 ± 0,2
C20:0	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,04
C20:1	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:0	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,05	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,02	1,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,03
C24:0	0,2 ± 0,08	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,03	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,02
C26:0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,01	0,6 ± 0,08	0,4 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,03	0,5 ± 0,1



**Figura 5.**Metabolismo do nitrogênio nas 10 cepas de microalga estudadas. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=4). Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.5. Perfil metabólico

A análise de CGEM permitiu a identificação de 57 metabólitos, pertencentes a diferentes classes, incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, açúcares fosfatados e poliaminas. De maneira geral, observou-se que as cepas BR023, BR017 e FURG apresentaram os maiores níveis para a maioria dos



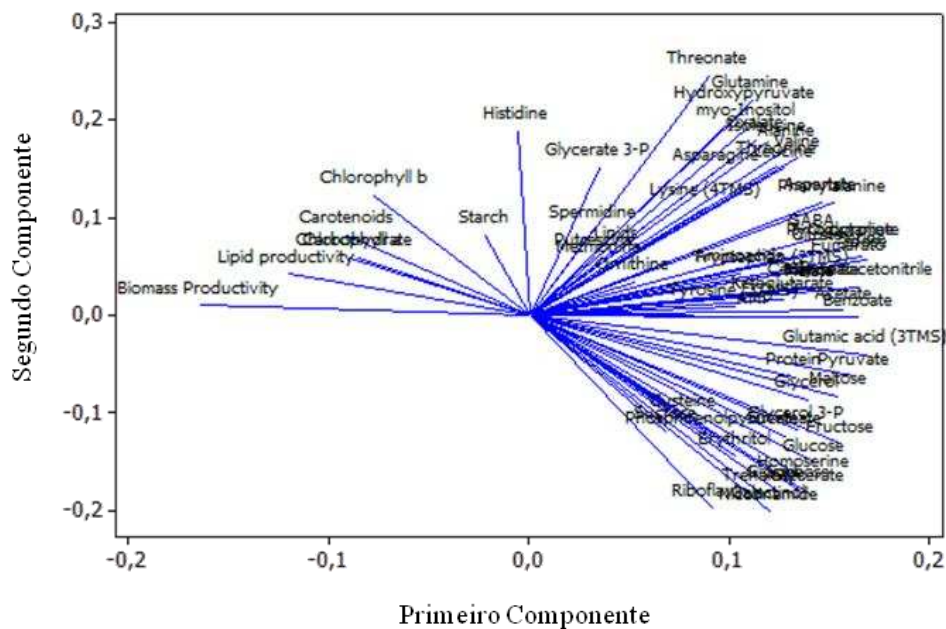
**Figura 6.** Mapa de calor representando as variações relativas no conteúdo dos metabólitos nas 10 cepas de microalgas. Os valores estão normalizados em relação ao padrão interno (Ribitol) e à média do metabólito calculada para todas as amostras. A escala de cor utilizada está representada na figura.

metabólitos encontrados, enquanto que as duas cepas de *Scenedesmus* (BR003 e BR024) apresentaram um perfil oposto, com os menores valores para a maioria dos metabólitos determinados (Figura 6). A cepa BR023 apresentou altos teores de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina), aromáticos (tirosina) e outros como lisina, alanina, glutamato, GABA dentre outros. Adicionalmente ao alto teor de aminoácidos esta cepa também apresentou altos valores de vários ácidos orgânicos, como o piruvato, o acetato e a maioria dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (citrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato e malato) e açúcares alcoóis, como glicol-3-fosfato e glicerol, que são precursores da biossíntese de ácidos graxos. Já em relação ao metabolismo de arginina e outras poliaminas os maiores teores foram encontrados nas cepas BR017 e FURG. Altos teores de ornitina, citrulina, putrescina e espermidina foram obtidos nestas cepas indicando uma possível diferença no metabolismo do nitrogênio em relação às outras cepas.

### **3.7. Análise de Componentes principais (PCA)**

Para verificar a contribuição de cada metabólito analisado, foram feitas análises multivariadas com decomposição em componentes principais. Esta análise reduziu todos os parâmetros quantificados a dois componentes principais, que explicaram 63,8% da variação total nos dados originais. O primeiro componente foi responsável por explicar 48,6% da variação total das amostras, e esteve largamente associado com parâmetros de produtividade de biomassa, teor de proteínas e metabólitos (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, dentre outros). O segundo componente explicou 15,2% da variação, e esteve relacionado

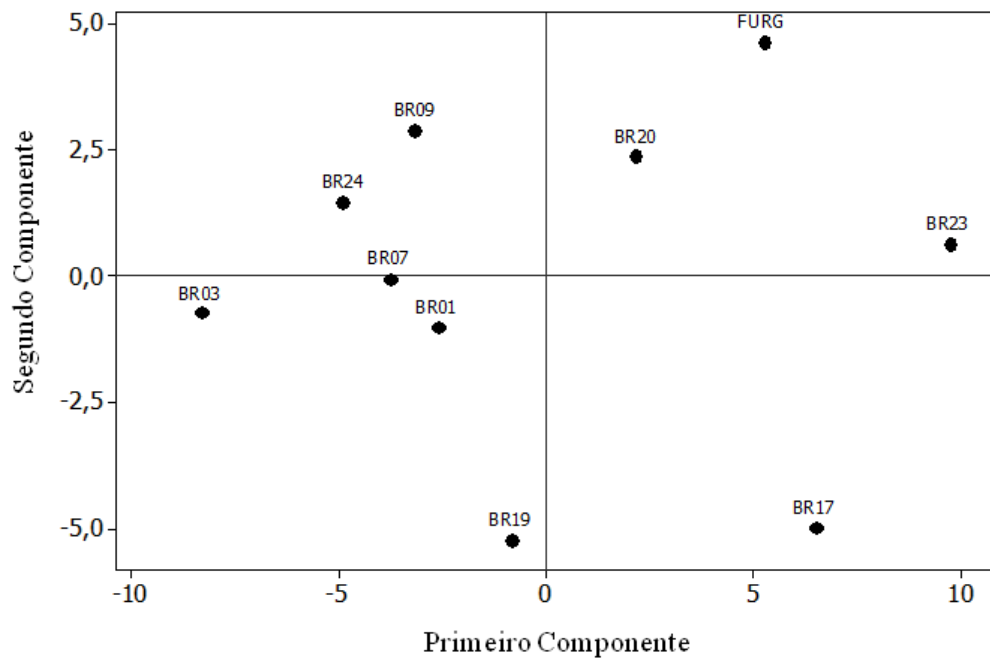
com os parâmetros bioquímicos (carboidrato, pigmentos, etc.) e metabólicos. Ao se analisar o primeiro componente (Figuras 7 e 8), observa-se que as cepas posicionadas em valores mais positivos do eixo exibiram os menores valores da maioria dos metabólitos quantificados. Já ao analisar o segundo componente, percebe-se que as amostras posicionadas em valores mais positivos apresentaram alto teor de certos aminoácidos (alanina, histidina, glutamina), enquanto cepas que apresentaram valores mais negativos apresentaram altos valores de açúcares e de alguns ácidos orgânicos (succinato, fosfoenolpiruvato).



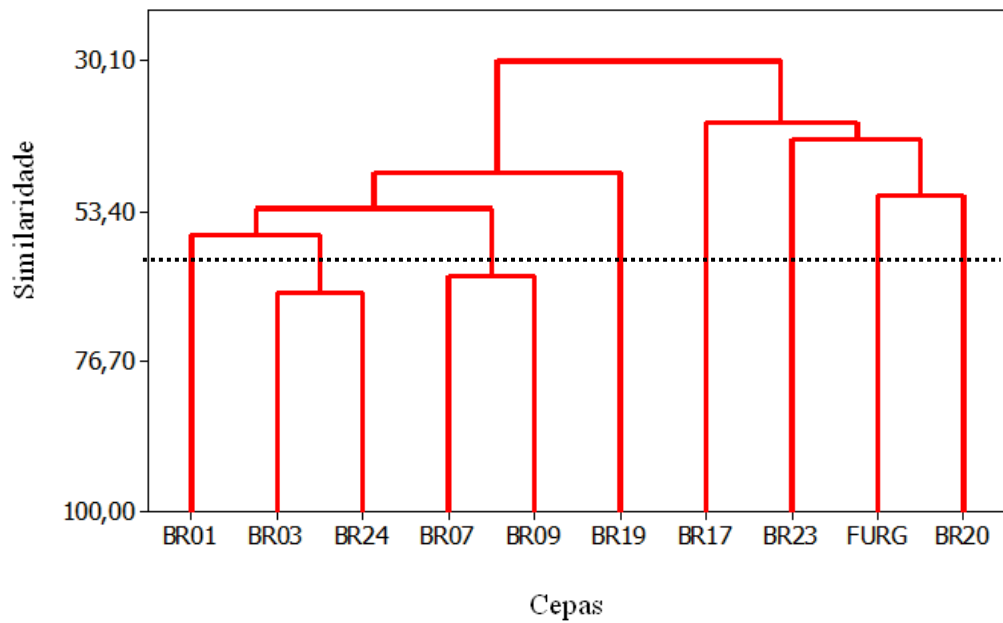
**Figura 7.** Análise dos dois primeiros componentes principais nas dez cepas de microalgas.

A análise dos dois primeiros componentes principais, juntamente com a análise de dendograma possibilitou a separação de quatro grupos principais, o primeiro formado pelas cepas BR001, BR003 e BR009; o segundo com BR009 e BR024; o terceiro com BR007, BR017, BR023 e FURG; e o último com a cepa

BR020 que não agrupou com nenhuma outra estirpe demonstrando um comportamento único em relação às demais cepas analisadas (Figura 9).



**Figura 8.** Distribuição das dez cepas de microalgas nos dois primeiros componentes principais.



**Figura 9.** Análise de dendograma com as 10 cepas de microalgas utilizando método de ligação pela média e de distância utilizando coeficiente de correlação de Pearson.

#### **4. Discussão**

Em processos de produção de óleo a partir de biomassa de microalgas, um dos principais objetivos daqueles que trabalham nesta área é o alto rendimento de lipídios por área (resultado da produtividade de biomassa e do conteúdo lipídico), uma vez que influencia enormemente nos custos de produção (Rudolfi et al., 2009). Dessa maneira, a escolha da cepa correta é um fator crítico para a viabilidade do processo. Alto teor de lipídios, taxas de crescimento altas, facilidade de recuperar a biomassa e a habilidade de adaptar as condições ambientais são, assim, critérios essenciais na seleção de cepas (Chaichalerm et al., 2011).

Acredita-se que estirpes nativas de microalgas possuem uma melhor adaptação as condições ambientes locais e apresentam um crescimento mais rápido que cepas não nativas (Chimera et al., 2010). Logo, várias espécies como *Scenedesmus obliquus*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis* sp. E *Chlorella protothecoides* têm sido isoladas de diferentes regiões (Larkum et al., 2011; Tang et al., 2011; Chaichalerm et al., 2011; Lim et al., 2012; Anandarajah et al., 2012). Dentre estas, o alto potencial de espécies do gênero *Scenedesmus* é relatado por apresentarem crescimento rápido e conteúdo lipídico, culminando em alta produtividade de lipídios (Song et al., 2013; Mandal & Mallick, 2009). No presente estudo, 10 cepas brasileiras de microalgas pertencentes à divisão Chlorophyta foram testadas quanto ao potencial para produção de biomassa e

lipídios, observando-se a presença de duas espécies de *Scenedesmus* que apresentaram alta produtividade de biomassa e de lipídios.

Todas as cepas aqui estudadas apresentaram uma fase lag muito curta, seguidas por uma fase log que variou de 2 a 6 dias, e uma fase estacionária de maior duração. Isto pode ser atribuído ao fato de que alta concentração inicial do inóculo desencadeia uma melhor adaptação à nova condição de cultivo e, portanto, proporcionam uma fase lag curta e um menor período de coleta (Lu et al., 2012). Cabe mencionar que isolados que exibem curvas de crescimento curta, com rápida entrada na fase estacionária, são desejáveis para a produção de biodiesel tendo em vista que microalgas apresentam a tendência de acumularem lipídios na fase estacionária. Isso ocorre, pois as células reduzem seu gasto energético em sucessivas divisões e passam a sintetizar substâncias de reserva (Hu et al., 2008; Willians & Laurens, 2010).

A produtividade de biomassa é um fator importante, pois é um indicativo da produtividade que pode ser mantida em cultivos contínuos (Griffiths et al., 2009). Os dados de produtividade deste estudo variaram entre  $0,134 \pm 0,007 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para BR003 e  $0,054 \pm 0,003 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para BR023. Embora esta cepa juntamente com as cepas de *Chlorella* (BR001, BR017 e FURG) tenha apresentado um alto número de células, o pequeno tamanho das células levou a menor produtividade. Chaichalerm et al. (2011) utilizando o meio BG-11 e condições de cultivo similares às usadas nesse estudo, obtiveram valores de biomassa e produtividade semelhantes aos encontrados, para diferentes espécies de microalgas. Tais autores relatam que a cepa com maior rendimento de biomassa foi *Scenedesmus acutus*, com valores de  $0,117 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , semelhante

ao encontrados para as cepas de *Scenedesmus* (BR003 e BR024) analisadas neste trabalho.

Todavia, os valores de produtividade obtidos no presente estudo são menores que os relatados por Rodolfi et al. (2009) que variam de 0,17 a 0,28mg.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para espécies de microalgas de água doce. Entretanto, essas diferenças na produtividade podem ser atribuídas a diferentes condições de cultivo utilizadas no presente trabalho, demonstrando que além do isolamento de cepas as condições de cultivo são fatores importantes para análise dos cultivos.

A biomassa é composta principalmente de proteínas, carboidratos e lipídios e a proporção dos mesmos pode variar conforme a espécie e as condições de cultivo (Vigeolas et al., 2012). Para a produção economicamente viável de biodiesel, a biomassa residual de microalgas constitui um importante fator. A biomassa desprovida de lipídios contém várias biomoléculas que podem ser utilizadas em outros processos tecnológicos (Hempel et al., 2012).

Em relação ao teor de carboidrato também ocorreram diferenças significativas entre as estirpes. Assim como neste estudo, Do Nascimento e colaboradores (2012) verificaram grande variação entre cepas de microalgas, sendo a menor porcentagem apresentada pelo estudo também observada em uma espécie do gênero de *Desmodesmus*. Embora o principal foco desse estudo tenha sido investigar microalgas para acúmulo de óleo, tornou-se evidente que algumas cepas parecem acumular teores relativamente altos de carboidratos. Assim, algumas dessas estirpes podem ser matérias-primas apropriadas para a produção de bioetanol ou biogás (Brennan & Owende, 2010). Além disso, os carboidratos podem ser reciclados no processo de produção de lipídios (Trzcinski et al., 2012). Quanto aos compostos de reserva, o maior teor de amido foi encontrado na

cepa *Chlamydomonas* sp. BR020, que uma espécie do gênero no qual frequentemente são encontrados altos teores de amido (Siaut et al., 2011). Já para os conteúdos de lipídios, também foram observado variações entre as cepas analisadas com valores normalmente acima 12% do peso seco. Vários autores têm reportado variações nos teores de óleos de microalgas, dependendo da cepa e das condições de cultivo, com valores variando de 10 à 30 % da biomassa. Geralmente os teores de óleo são inversamente proporcionais a produtividade de biomassa devido ao alto custo metabólico da biossíntese de lipídios (Do Nascimento et al., 2012; Griffiths et al., 2011; Rodolfiet al., 2009). Estes resultados corroboram com os dados obtidos no presente estudo, pois a maior porcentagem de óleo foi encontrada para a cepa BR023, a qual apresentou menor produtividade de biomassa. Yu e colaboradores (2012) também reportam altos conteúdo de lipídios e baixa produtividade em cultivos autotróficos para estirpe *Monoraphidium* sp. FXY-10.

O amido e o lipídio são os principais compostos de reserva em algas verdes e constituem os dois maiores drenos de carbono em células com baixa taxa de divisão celular e, portanto, apresentam uma competição por este recurso (Siaut et al., 2011). Quando o crescimento celular diminui a fotossíntese continua, mesmo que a taxas menores, e ocorre uma mudança no metabolismo, de modo que os fotoassimilados são armazenados em compostos de reserva garantindo a sobrevivência da alga em condições desfavoráveis (Ördög et al., 2012). Essas reservas celulares requerem muito gasto energético e a interação entre a biossíntese de ácidos graxos e carboidratos e sua regulação em microalgas têm sido amplamente investigados. Em um desses estudos, por exemplo, demonstrou-se que a inativação da ADP-glicose-pirofosforilase de um mutante que não produz

amido em *Chlamydomonas* pode levar a um aumento de 10 vezes nos teores de TAGs (Recht et al., 2014).

O amido é considerado o principal carboidrato de reserva em muitas algas e plantas e a sua síntese compartilha muitos precursores com a síntese de lipídios, como os intermediários do ciclo de Calvin (gliceraldeído-3fosfato, e 3-fosfoglicerato). Muitas algas, especialmente as verdes, utilizam amido como composto de reserva e altas taxas de síntese de TAG ocorrem apenas quando a oferta de carbono excede a capacidade de síntese de amido ou na ausência de produção de carboidratos de reserva (Fan et al., 2012). No presente trabalho o acúmulo dessas reservas variou amplamente entre as cepas não apresentando um padrão entre gêneros ou espécies, com algumas cepas apresentando maior tendência no acúmulo de amido enquanto outras no de óleo. Demonstrando a importância da melhor compreensão sobre a regulação da síntese dessas reservas em microalgas.

A produtividade de lipídios também variou entre as estirpes testadas. As duas cepas de *Scenedesmus* estudadas apresentaram alto valor de produtividade de lipídios. Embora, não tenham apresentado o maior teor de lipídios, a alta produtividade de biomassa somada ao teor de lipídio, garantiram uma alta produtividade de lipídio nessas cepas. Ademais, a produtividade de biomassa teve uma correlação positiva com o teor de lipídios, semelhante ao reportado por Hempel et al. (2012). Rodolfi et al (2011) em um trabalho de caracterização de microalgas de água doce sugerem espécies do gênero *Scenedesmus* como as de maior potencial para utilização em cultivos comerciais destinados a produção de lipídios e biocombustíveis, corroborando que o gênero tem capacidade para alta produção de óleo.

Assim como o conteúdo de lipídios, o teor de FAMES variou entre as diferentes cepas testadas, com as maiores taxas encontradas na cepa BR023. Já em relação ao perfil de ácido graxo, os FAMES insaturados de 18 carbonos (ácido oléico - C18:1, linoléico - C18:2, e  $\alpha$ -linoléico C18:3) foram os mais abundantes, seguidos pelo ácido palmítico (C16:0) e os insaturados de 16 carbonos (C16:1, C16:2 e C16:3). Esses valores são similares aos reportados na literatura para algas de água doce (Griffiths et al., 2011) e a alta proporção de C16 e C18 indicam que o óleo produzido por todas as cepas pode ser adequado para a produção de biodiesel (Limet et al., 2012). Dentre as cepas testadas, BR003, BR023 e BR024 se destacaram por apresentarem altos teores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e baixo teor de poliinsaturados, conferindo características importantes como estabilidade oxidativa e alto ponto de névoa (Song et al., 2013). Ao passo que as cepas BR017 e BR020 apresentaram maiores teores de poliinsaturados e podem ser importantes na indústria de alimentos.

Considerando o metabolismo do nitrogênio, os conteúdos de proteína de aminoácidos totais foram maiores nas cepas BR017 e BR020. Em microalgas de água doce o conteúdo de proteína pode variar de 11 a 46% (p/p) (Boyd, 1973). No presente estudo, verificou-se que os teores de proteína apresentaram uma tendência de diminuição com o aumento da produtividade de biomassa (Figura suplementar S1 e S2). Isso se explica pelo fato de que baixas taxas de crescimento contribuem para o acúmulo destes compostos, em relação às células sob altas taxas de produtividade (Bermúdez et al., 2004). A quantidade de proteína na biomassa, após a extração de óleo para a produção de biodiesel, é de grande interesse comercial, pois estas proteínas podem ser utilizadas na alimentação humana ou animal (Spolaore et al., 2006)

Assim como proteínas e aminoácidos, os pigmentos são utilizados como reserva de nitrogênio pela célula. A clorofila é um composto rico em nitrogênio e facilmente acessível, que é utilizado para manter o crescimento celular e a produção de biomassa, quando ocorre limitação de nitrogênio no meio de cultivo (Ördöget al., 2012). No presente estudo foram observadas grandes diferenças entre as estirpes para a quantidade de clorofila. Contudo, não foi observado correlação entre os níveis de pigmentos e o crescimento. No entanto, esses dados são consistentes com os de Ratha e colaboradores (2012) que relataram cepas com baixo teor de clorofila com alta produção de biomassa.

Em contraste com o observado para os outros pigmentos a cepa BR009 apresentou alta concentração de clorofila b, que foi responsável por uma baixa razão da clorofila a/b. Esta cepa apresenta uma característica importante, pois as células, além de ter dimensões grandes, formam aglomerados celulares que tendem a diminuir a penetração de luz na cultura o que pode explicar a redução na razão entre as clorofilas. Uma vez que a relação clorofila a/b tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa devido a uma maior proporção relativa de clorofila b em ambiente com menor incidência de luz (Freiberger et al. 2010). Alguns trabalhos demonstram que mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii*, com complexo antena reduzido, gerados por supressão na síntese de clorofila b, aumentam a penetração de luz no meio de cultura líquido, tornando mais eficiente a conversão de energia solar em biomassa e aumentando, assim, o rendimento dos mesmos (Rosenberg et al, 2008; Perrine et al., 2012).

A análise dos coeficientes de correlação de Pearson juntamente com o primeiro componente da análise multifatorial sugere que as cepas com maiores taxas de produção de biomassa apresentam menores valores para a maioria dos

metabólitos quantificados, como por exemplo, aminoácidos e ácidos orgânicos (intermediários do ciclo TCA). Tais relações têm sido observadas em outros trabalhos quando as microalgas são cultivadas sob condições de estresse, na qual ocorre inibição do crescimento e acúmulo de metabólitos como aminoácidos, intermediários do ciclo TCA, frequentemente associados com acúmulo de óleo na célula, demonstrando uma regulação na produção de biomassa e metabolismo celular (Ho et al., 2014; Recht et al., 2014). Neste trabalho foram avaliados cultivos na fase estacionária, que é uma fase na qual normalmente ocorre limitação nutricional, o que pode restringir o crescimento e causar uma reprogramação metabólica. No entanto, a maneira como cada cepa percebe e responde a estes fatores é específico o que explica as diferenças obtidas e sugere a necessidade de um melhor estudo das vias que controlam o crescimento e o metabolismo em respostas a fatores ambientais nestes organismos.

Coletivamente os resultados obtidos no presente estudo sugerem que cepas diferentes de microalgas possuem características metabólicas intrínsecas que mesmo pertencendo ao mesmo gênero ou espécie podem diferir em condições de cultivo idênticas, como pode ser evidenciado na análise de dendograma em que cepas de organismos próximos filogeneticamente não foram agrupados. Provavelmente, devido a fatores genéticos que estão relacionados com a expressão e regulação de genes, o que reforça, portanto, a necessidade de mais estudos para compreender a fisiologia e o metabolismo destes organismos.

## 5. Conclusão

Utilizando a produtividade de biomassa e lipídios como parâmetros para a escolha de microalgas, as cepas *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 e *Scenedesmus obliquus* BR003 foram apontadas como as de maior produção de óleo e biomassa. No entanto, as cepas *Chlamydomonas* sp. BR020 e *Chlorella vulgaris* BR017 também se destacaram por apresentarem maiores teores de ácido  $\alpha$ -linolénico e proteínas o que possibilita a utilização destas na perspectiva de bio-refinárias e geração de produtos de altos valores agregados. Além disso, é importante salientar que os resultados demonstraram que o metabolismo e a fisiologia destes organismos é bastante variado e o acúmulo de reservas e variou com algumas cepas apresentando maior tendência no acúmulo de amido enquanto outras no de óleo, mesmo em condições de cultivo idênticas. Demonstrando a importância de uma maior compreensão sobre a regulação da síntese de reservas em microalgas para melhorar o desempenho de cultivos.

## 6. Referências bibliográficas

Aguiar, R. E. (2000) Systematic and Ultrastructure of New and Rare Chrysophytes from Colorado and Wyoming Lakes. Ph. D. Dissertation. Colorado. Colorado State University. USA. 280p.

Almeida, G. P. (2012) Análise do papel da via de sinalização sensível à rapamicina na expressão gênica e multiplicação celular de *Chlamydomonas reinhardtii*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Campinas, Campinas-SP.

Anandarajah K., Mahendrapurumal G., Sommerfeld M., Hu Q. Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Applied Energy*, 96: 371-377.

Andersen, R. A. (2005) *Algal culturing techniques*, first ed. Elsevier Academic Press, Burlington.

Bermúdez J., Rosales N., Loreto C., Briceño B., Morales E. (2004) Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 179-183.

Bicudo C.E.M., Menezes M. (2005) *Gêneros de algas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. São Carlos: Rima.

Bligh E.G., Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37: 911-917, 1959.

Boyd C.E. (1973) Amino acids composition of freshwater algae. *Arch Hydrobiol* 73: 79-99

Bölling C., Fiehn O. (2005) Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiology*, 139: 1995-2005.

Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Rev*, 14: 557–577.

Caldana C., Li Y., Leisse A., Zhang Y, Bartholomaeus L., Fernie A. R., Willmitzer L., Giavalisco P. (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 73: 897–909.

Chaichalerm S., Pokethitiyook P., Yuan W., Meetam M., Sritong K., Pugkaew W., Kungvansaichol K., Kruatrachue M., Damrongphol P. (2012) Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, 89: 296-302.

Chimera C.G., Buddenhagen C.E., Clifford P.M.(2010) Biofuels: the risks and dangers of introducing invasive species. *Biofuels*, 1: 785–796.

Chisti, Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26:126–131.

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advanced* 25:294–306.

Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P., Borghi M.D. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemistry. Energy. Process*, 48: 1146-1151.

Couto, L.C.; Couto, L.; Watzlawick, L.F.; Barcellos, D.C., Mueller, M. (2007) Biodiesel: uma revisão. *Biomassa & Energia*. 3:137-183.

Cruz CD (2007) Genes versão 2007: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV

Cuadros-Inostroza A., Caldana C., Redestig H., Kusano M., Lisec J., Pena-Cortes H., Willmitzer L., Hannah M.A. (2009) Target search – a bioconductor package for the efficient preprocessing of GC–MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics*, 10, 428.

Deng, X.; Fei, X. e Li, Y. (2011) The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5:260-270.

Do Nascimento M., Ortiz-Marquez J. C. F., Sanchez-Rizza L., Echarte M. M., Curatti L. (2012) Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South–Eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresource Technology*, 125: 283 – 290.

Doyle J. J., Doyle J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 – 15.

Fan J., Yan C., Andre C., Shanklin J., Schwender J., Xu C. (2012) Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiology*, 53: 1380-1390.

Feng Y., Li C., Zhang D. (2011) Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, 102:101–105.

Fernie A.R., Aharoni A., Willmitzer L., Stitt M., Tohge T., Kopka J., Carroll A.J., Saito K., Fraser P.D., DeLuca V. (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell*, 23: 2477-2482.

Fernie A.R., Roscher A., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212: 250-263.

Freiberger M. B., Castoldi G., Marini D., Lang A., Herzog N. F. M., Malavasi U. C. (2011). Variação sazonal de clorofilas em folhas de *Tabebuia avellanedae* e *Anadenanthera colubrina*. *Semina: Ciências Agrárias*, 31: 1343-1348.

Gibon Y., Blaesing O.E., Hannemann J., Carillo P., Hohne M., Hendriks J.H.M., Palacios N., Cross J., Selbig J., Stitt M. (2004) A robot-based platform to measure multiple enzymes activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes in enzymes activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, 16: 3304-3325.

Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal Ind. Microbiology Biotechnology*, 36:269–274.

Griffiths M.J., Garcin C., van Hille R.P., Harrison S.T.L. (2011) Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal Microbiology Methods*. 85: 119-123.

Griffiths M.J., van Hille R.T., Harrison S.T.L. (2011) Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal Applied of Phycology*, 24: 989-1001.

Griffiths, Melinda J. & Harrison, Susan T. L. (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal Applied of Phycology*, 21:493–507.

Hamsher S.E., Evans K.M., Mann D.G., Poulícková A., Saundersa G.W. (2011) Barcoding Diatoms: Exploring Alternatives to COI-5P. *Protist*, 162: 405 – 422.

Hempel N., Petrick I., Behrendt F. (2012) Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as a key characteristic of suitability for biodiesel production. *Journal Applied of Phycology*, 24: 1407-1418.

Ho S. H., Nakanishi A., Ye X., Chang J. S., Hara K., Hasunuma T., Kondo A. (2014) Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnology for biofuels*, 7: 97.

Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M. e Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54: 621–63.

Illman A.M.; Scragg A.H., Shales S.W. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:631–635.

Jiang, Q., Zhao L., Dai J., Wu Q. (2012) Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. *PLoS One*, 7: e41826.

Khan, S. A.; Rashmi; Hussain, Z. M.; Prasad, S. e Banerjee, U. C. (2009) Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:2361–23.

Ki J., Cho S., Katano T., Jung S.W., Lee, J., Park B.S., Kang S., Han M. (2009) Comprehensive comparisons of three pennate diatoms, *Diatomatenuae*, *Fragilaria vaucheriae*, and *Navicula pelliculosa*, isolated from summer Arctic reservoirs (Svalbard 79°N), by Wne-scale morphology and nuclear 18S ribosomal DNA. *Polar Biology*, 32: 147 – 159.

Kugrens, P., Clay, B.L., Aguiar, R. (2000) Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, gen. et sp. nov.(Chlorophyta, Characiosiphonaceae), an unusual coenocyte from Colorado. *Journal Phycology*, 36:421-432.

Kumar, A.; Ergas, S.; Yuan, X.; Sahu, A.; Zhang, Q.; Dewulf, J.; Malcata, F. X. e Langenhove, H. van. (2010) Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28:371-380.

Larkum A.W., Ross I.L., Kruse O. and Hankamer B. (2011) Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnology*. 30: 198-205.

Laurens L.M., Quinn M., Van Wychen S., Templeton D.W. And Wolfrum E.J. (2012) Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Anal Bioanal Chemistry*, 403: 167-178.

Lee, R. E. (2008) *Phycology*. Cambridge University Press.

Li Y., Han D., Hu G., Dauvillee D., Sommerfeld M., Ball S., Hu Q. (2010) *Chlamydomonas starchless* mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metabolic Engineering*, 12: 387–391.

Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2011) Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 101:123-129.

Lim D.K., Garg S., Timmins M., Zhang E.S., Thomas-Hall S.R., Schuhmann H., Li Y. and Schenk P.M. (2012) Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *PLoS One*.7(7): p.e40751.

Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R. (2006) Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1: 387 – 396.

Lu S., Wang J., Niu Y., Yang J., Zhou J. and Yuan Y. (2012) Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. *Biotechnology Bioengineering*, 109: 1651-1662

Lucarini, A.C., Kilikian, B.V. (1999) Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology Technology*. 13: 149-154.

Lv J.M, Cheng L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L. (2010) Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101:6797-6804

Mandal, S. & Mallick, N. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84:281-291.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochemistry*, 339: 69-72.

Meijer, E.A., Wijffels, R.H. (1998) Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. *Biotechnology Technology*, 12: 353-358

Obata T., Schoenefeld S., Krahnert I., Bergmann S., Scheffel A., Fernie A.R. Gas-chromatography mass-spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling reveals mannitol as a major storage carbohydrate in the Coccolithophorid alga *Emiliana huxleyi*. *Metabolites*, 3: 168- 184.

Ördög V., Stirk W. A., Bálint P., van Staden J., Lovász C. (2012) Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24: 907-914.

Parmar, A.; Singh, N. K.; Pandey, A.; Gnansounou, E. e Madamwar, D. (2011) Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102: 10163-10172.

Perrine Z., Negi S., Sayre R.T. (2012) Optomization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. *Algal Research*, 1: 134-142.

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – (2009) Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Testes e ensaios para validação do uso da

mistura biodiesel B5 em motores e veículos. Ministério da Ciência e Tecnologia/  
Governo Federal do Brasil. Brasília.

Ratha S.K., Prasanna R., Gupta V., Dhar D.W. and Saxena A.K. (2012)  
Bioprospecting and indexing the microalgal diversity of different ecological  
habitats of India. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28: 1657-1667.

Recht L., Toepfer N., Gibon A.S.B., Nikoloski Z., Fait A., Boussiba S. (2014)  
Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for  
carbon partitioning under nitrogen-starvation in the green alga  
*Haematococcuspluvialis*. *Journal Biology Chemistry*, 2.

Rodolfi L., ChiniZittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G. and  
Tredici M.R. (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid  
synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor.  
*Biotechnology Bioengineering*, 102:100-112.

Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L. and Betenbaugh M.J. (2008) A green  
light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology  
revolution. *Current Opinion Biotechnology*, 19: 430-436

Scott S.A., Davey M.P., Dennis J.S., Horst I., Howe C.J., Lea-Smith D.J. and  
Smith A.G. (2010) Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current  
Opinion Biotechnology*. 21: 277-286

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. (1998) A look back at the U.S.  
Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. Close-  
Out report. National Renewable Energy Lab, Department of Energy, Golden,  
Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190.

Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y. e Peltier, G. (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 11:1–15.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101: 87-96.

Song M., Pei H., Hu W., Ma G. (2013) Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 141: 245 – 251.

Tang H., Chen M., Garcia M.E., Abunasser N., Ng K.Y. and Salley S.O. (2011) Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnology Bioengineering*, 108: 2280-2287

Teoh, M.L., Chu, W.L., Marchant, H., Phang, S.M. (2004) Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *Journal Applied Phycology*, 16: 421-430.

Trzcinski, A.P., Hernandez, E., Webb, C., (2012) A novel process for enhancing oilproduction in algae biorefineries through bioconversion of solid by-products. *Bioresource Technology*, 116: 295–301.

Vigeolas H., Duby F., Kaymak E., Niessen G., Motte P., Franck F. and Remacle C. (2012) Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. *Journal Biotechnology*, 162: 3-12.

Wang B. And Lan C.Q. (2011) Optimising the lipid production of the green alga *Neochloris oleoabundans* using Box-Behnken experimental design. *The Canadian Journal Chemical Engineering*, 89: 932-939.

Wang S.T., Pan Y.Y., Liu C.C., Chuang L.T. Nathan C.N. (2010) Characterization of a green microalga UTEX 2219-4: Effects of photosynthesis and osmotic stress on oil body formation. *Botanical Studies*, 52: 305-312.

Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers or different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313

White T.J., Bruns T., Lee L., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, 315 – 322.

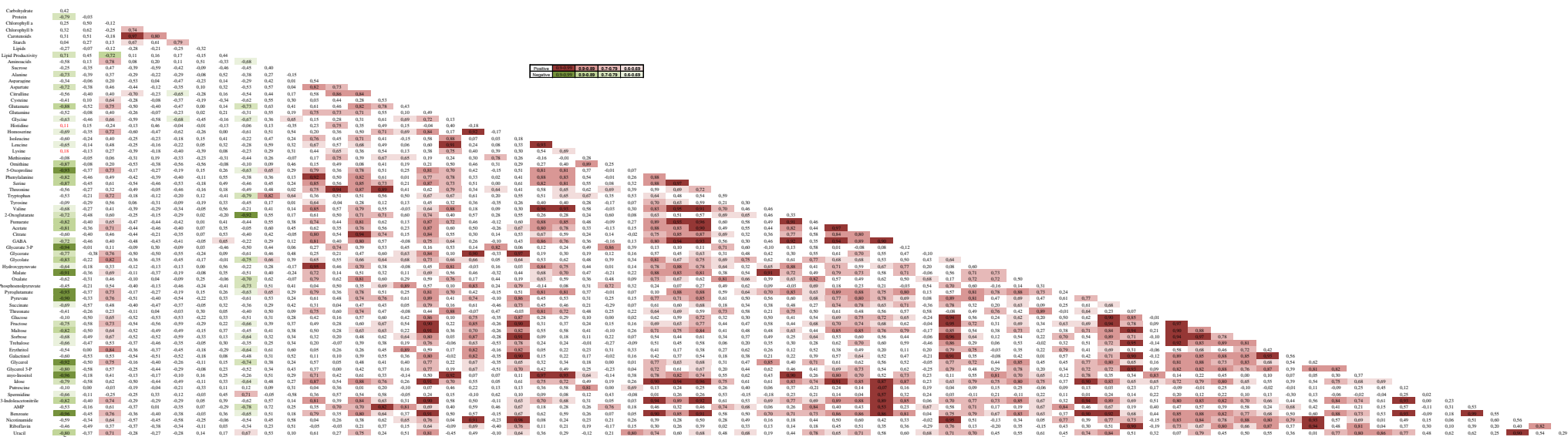
Williams P.J.B., Laurens L.M.L. (2010) Microalgae as biodiesel & biomass feedstock: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environmental Science*,3: 554-59.

Wood, A.M., Everroad, R.C., Wingard, L.M.(2005) Measuring growth rates in microalgal cultures, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal culturing techniques*, first ed. ElsevierAcademic Press, Burlington, pp. 269-285

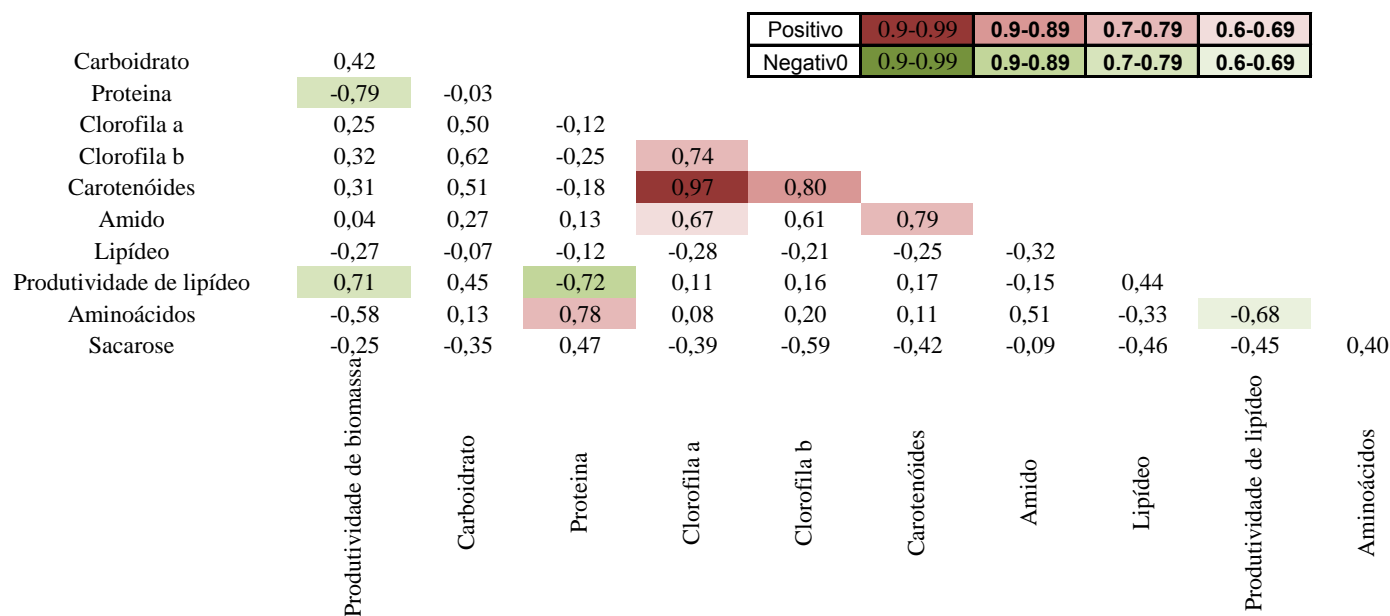
Yang C., Hua Q., Shimizu K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6:87-102.

Yu X., Zhao P., He C., Li J. Tang X., Zhou J., Huang Z. (2012) Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 121: 256 – 262.

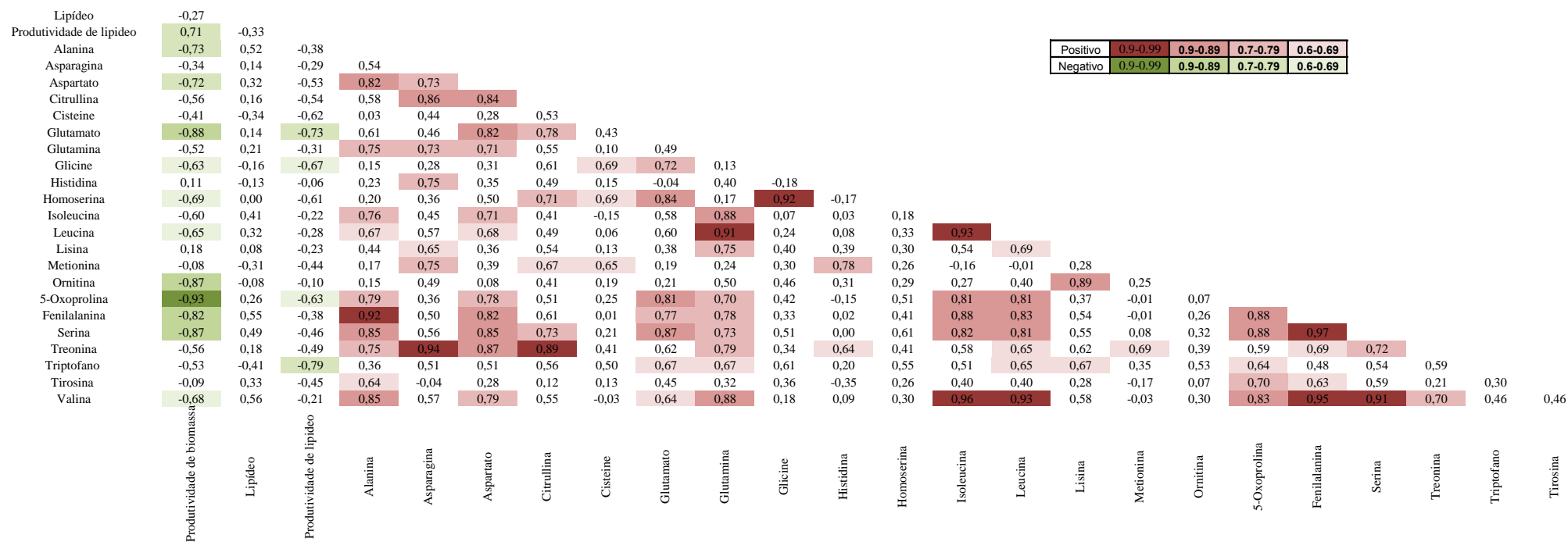
## **7. Material suplementar**



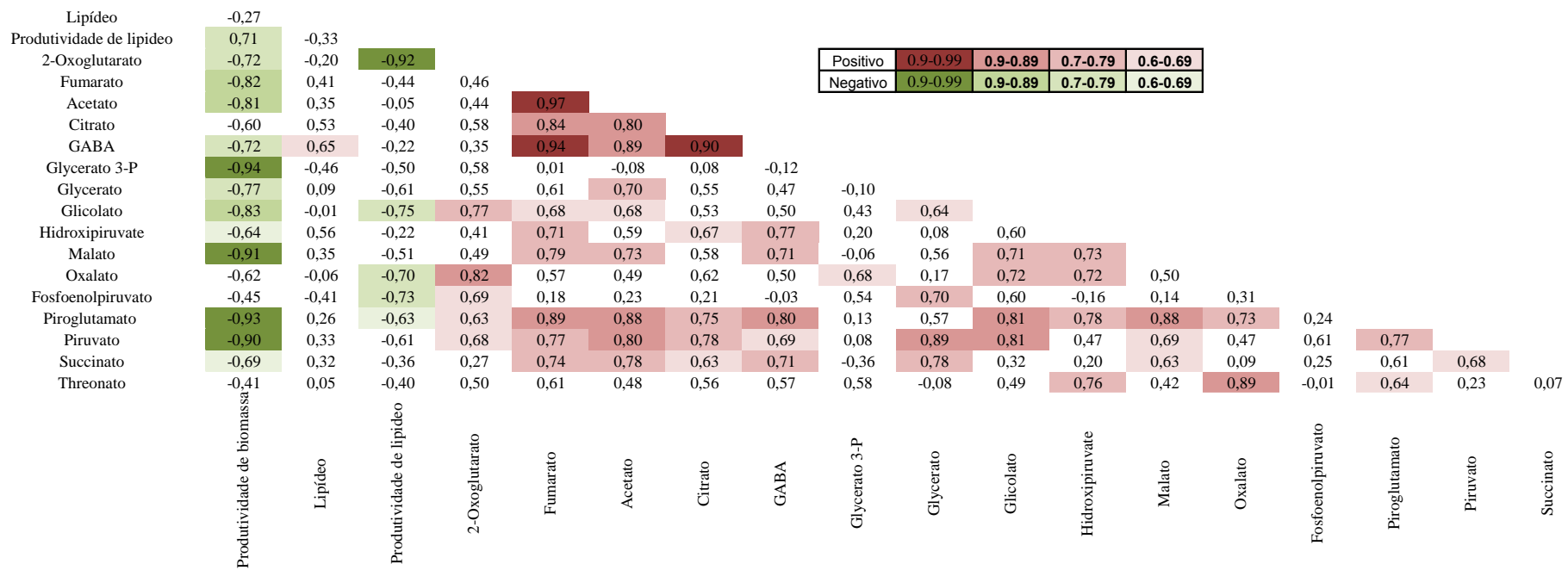
**Figura suplementar 1.** Coeficiente de correlação de Pearson entre todas as variáveis analisadas nas dez cepas de microalgas. Os coeficientes foram obtidos a partir da média das variáveis (n=4). Coeficientes de correlação marcados com cor são estatisticamente significantes a  $P \leq 0,05$ . A escala de cor utilizada está representada na figura.



**Figura suplementar 2.** Coeficiente de correlação de Pearson entre a produtividade de biomassa, carboidrato, proteína, clorofila a, clorofila b, carotenóides, amido, lipídeo, produtividade de lipídios, aminoácidos. Os coeficientes foram obtidos a partir da média das variáveis (n=4). Coeficientes de correlação marcados com cor são estatisticamente significantes a  $P \leq 0,05$ . A escala de cor utilizada está representada na figura.



**Figura suplementar 3.** Coeficiente de correlação de Pearson entre a produtividade de biomassa , produtividade de lípidios, e todos aminoácidos. Os coeficientes foram obtidos a partir da média das variáveis (n=4). Coeficientes de correlação marcados com cor são estatisticamente significantes a  $P \leq 0,05$ . A escala de cor utilizada está representada na figura.



**Figura suplementar 4.** Coeficiente de correlação de Pearson entre a produtividade de biomassa, produtividade de lipídios, e os ácidos orgânicos. Os coeficientes foram obtidos a partir da média das variáveis (n=4). Coeficientes de correlação marcados com cor são estatisticamente significantes a  $P \leq 0,05$ . A escala de cor utilizada está representada na figura.