

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO À LUZ NO CULTIVO AUTOTRÓFICO DE *Chaetoceros calcitrans*

DANIELA ALMEIDA NOGUEIRA, NATÁLIA TORRES RIBEIRO, JULIANE MACHADO DA SILVEIRA, ÉVELIN MENDES VIDAL, CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT¹

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar o efeito dos ciclos de fotoperíodo no metabolismo da diatomácea *Chaetoceros calcitrans* em termos de produção de biomassa e acúmulo de lipídios. Os experimentos foram conduzidos em estufa com fotoperíodo, iluminância de 3000 lx, aeração de 0,2 L min⁻¹ e temperatura de 30°C, sendo testados os ciclos de 12C:12E h e 24C:0E h (C = Claro; E = Escuro). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste t a 95% de confiança (p≤0,05). O ciclo de fotoperíodo 24C:0E h proporcionou maior acúmulo de lipídios (13,5%), biomassa máxima (0,54 g L⁻¹) e produtividade máxima (0,07 g L⁻¹ dia⁻¹), em comparação como ciclo de 12C:12E h, que apresentou valores significativamente menores de conteúdo lipídico (6,0%), biomassa máxima (0,22 g L⁻¹) e produtividade máxima (0,02 g L⁻¹ dia⁻¹), indicando que o tempo de exposição à luminosidade afeta o metabolismo deste micro-organismo.

PALAVRAS-CHAVE: MICROALGAS. FOTOPERÍODO. LIPÍDIOS MICROBIANOS. DIATOMÁCEAS

LIPID PRODUCTION AT DIFFERENT LIGHT EXPOSURE TIMES IN AUTOTROPHIC CULTIVATION OF *Chaetoceros calcitrans*

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of photoperiod regimes in the metabolism of the diatom *Chaetoceros calcitrans* in relation to biomass production and lipid accumulation. The experiments were performed in an incubator with photoperiod, illuminance of 3,000 lx, aeration of 0.2 L min⁻¹ and temperature of 30°C, testing the regimes 12L:12D h and 24L:0D h (L = Light; D = Dark). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and t-test at 95% confidence level (p≤0.05). The photoperiod regime 24L:0D h provided higher lipid accumulation (13.5%), maximum biomass concentration (0.54 g L⁻¹) and maximum productivity (0.07 g L⁻¹ day⁻¹), in comparison with the regime 12L:12D h, that presented significantly lower values of lipid content (6.0%), maximum biomass concentration (0.22 g L⁻¹) and maximum productivity (0.02 g L⁻¹ day⁻¹), indicating that the time of exposure to luminosity affects the metabolism of this microorganism.

KEYWORDS: MICROALGAE. PHOTOPERIOD. MICROBIAL LIPIDS. DIATOMS.

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: burkert@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade de vida, aliada à escassez dos recursos naturais, tem gerado a necessidade de obter novas tecnologias de produção que diminuam danos ambientais, que utilizem os recursos e insumos de forma eficiente e que contribuam para a diminuição de custos de produção. Nesse contexto, as microalgas vêm ganhando destaque no setor de biotecnologia em função de sua ampla aplicação. Em especial, os lipídios de microalgas possuem características interessantes, tendo aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, assim como na produção de biodiesel. Tais lipídios têm em sua composição ácidos graxos poli-insaturados, sendo estes de grande interesse comercial [1, 2].

As microalgas são organismos fotossintetizantes capazes de produzir diversos compostos de interesse comercial. A capacidade de transformar o carbono inorgânico em carbono orgânico através de seu metabolismo torna o cultivo de microalgas interessante em processos biotecnológicos, diminuindo os custos com substratos. As microalgas possuem a característica de se adaptarem às condições ambientais e físicas a que são submetidas. Fatores externos, como temperatura, intensidade da luz e fotoperíodo, são parâmetros que causam o estresse físico, podendo desempenhar papel significativo no metabolismo das microalgas, especificamente na síntese de lipídios [3].

Nos cultivos em que luz está envolvida (tanto autotrófico quanto mixotrófico), é importante levar em consideração a intensidade luminosa ou iluminância, assim como o tempo de exposição a essa intensidade luminosa, conhecido como ciclo de fotoperíodo, pois alterações nestes fatores contribuem para o aumento ou redução da biomassa microalgal, assim como no conteúdo lipídico [4, 5, 6].

A espécie *Chaetoceros calcitrans* é uma microalga marinha unicelular, diatomácea de simetria cêntrica, pertencente à classe Bacillariophyceae. Uma de suas características é a capacidade de se adaptar rapidamente e crescer em diferentes instalações de cultivo, abertas ou fechadas. Esta microalga vem sendo estudada para a produção de carotenoides como a fucoxantina [7] e na alimentação de peixes e camarões, por sua atividade antibacteriana [8]. Outros estudos relacionados à microalga estão direcionados à sua capacidade de crescimento em diferentes concentrações de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e silicato [9], e na produção de lipídios [10].

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos ciclos de fotoperíodo no metabolismo da microalga *Chaetoceros calcitrans* para a produção de biomassa e acúmulo de lipídios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *Chaetoceros calcitrans*, cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia – UFBA (Salvador, Bahia).

2.2. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizado o meio Conway [11], constituído por água marinha natural com salinidade ajustada em 28 ups (unidades práticas de salinidade) acrescida de solução principal (2 mL L^{-1}), solução de silicatos (2 mL L^{-1}) e solução de vitaminas ($0,1\text{ mL L}^{-1}$).

A solução principal foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): $45\text{ C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $33,6\text{ H}_3\text{BO}_3$; 100 NaNO_3 ; $0,36\text{ MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $1,3\text{ FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $20\text{ NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; e 1 mL L^{-1} de solução contendo (g L^{-1}) 21 ZnCl_2 , $20\text{ CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $9\text{ (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $20\text{ CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A solução de silicatos foi preparada com o seguinte componente (g L^{-1}): $40\text{ Na}_2\text{OSiO}_2\cdot n\text{H}_2\text{O}$. A solução de vitaminas foi preparada com os seguintes componentes (g L^{-1}): $0,05\text{ Vitamina B}_{12}$ e 1 Vitamina B_1 .

No preparo do inóculo, a microalga *Chaetoceros calcitrans* foi cultivada em frascos *Erlenmeyer* de 1 L, contendo meio Conway [11], utilizando água marinha com ajuste de salinidade em 28 ups. Os frascos foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil) no ciclo 24C:0E h (C = Claro; E = Escuro), onde a iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com iluminância de 3000 lx , sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de $0,2\text{ L min}^{-1}$, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para prover a filtração do ar. A temperatura foi mantida em $24 \pm 1^\circ\text{C}$. A injeção de ar, além da aeração, teve a finalidade de promover a agitação a fim de manter o sistema de cultivo homogêneo. O cultivo foi interrompido quando a concentração de biomassa atingiu $0,55\text{ g L}^{-1}$, conforme estabelecido por Nogueira [12].

2.3. Cultivo nos fotobiorreatores

2.3.1. Inoculação

Frascos *Erlenmeyer* de 1 L, contendo meio Conway de mesma composição [11], foram inoculados com a suspensão de microalgas, resultando em volume total de 900 mL. O volume de inóculo adicionado, cuja propagação foi descrita no item 2.2., correspondeu a 10% do volume de meio estéril [13].

2.3.2. Condições de cultivo

Os frascos *Erlenmeyer* foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil), cuja iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com iluminância de 3000 lx, sendo realizada a injeção direta e constante de ar atmosférico na vazão de 0,2 L min⁻¹, visando a aeração e agitação, através de um sistema de bomba do tipo aquário e filtro de lã de vidro para prover a filtração do ar [12]. A temperatura foi ajustada em 30°C. Foram testados os ciclos 12C:12E h e 24C:0E h.

2.3.3. Acompanhamento da biomassa

Alíquotas dos cultivos foram retiradas a cada 24 h e centrifugadas a 13.000 x g por 15 min (Eppendorf, modelo 5804-R, Alemanha). O sedimento foi lavado, novamente centrifugado e ressuspenso em água.

A concentração de biomassa foi estimada por medida da absorvância a 680 nm em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220, China), e posterior conversão à concentração (g L⁻¹) por uma curva de calibração previamente construída que relaciona a absorvância e a massa seca de biomassa [14].

A avaliação do crescimento celular nos cultivos foi realizada a partir da determinação da biomassa máxima (X_{max} , g L⁻¹) e biomassa final (X_{final} , g L⁻¹). A biomassa máxima compreende o valor máximo de biomassa obtido no experimento, enquanto que a biomassa final corresponde à biomassa no término do cultivo, ambas expressas como massa seca por volume.

A produtividade corresponde à quantidade de biomassa produzida em um determinado intervalo de tempo, tendo sido calculada a produtividade de biomassa máxima (P_{max} , em g L⁻¹ h⁻¹) e produtividade de biomassa final (P_{final} , em g L⁻¹ h⁻¹), considerando, respectivamente, as biomassas máxima e final e os tempos de cultivo correspondentes.

2.3.4. Conteúdo lipídico

Ao término dos experimentos (10 dias), a biomassa obtida passou por uma etapa de separação (biomassa/meio de cultivo), sendo centrifugada a 18.800 x g por 15 min (Hitachi, modelo CR22GIII, Japão), em seguida a célula foi lavada e novamente centrifugada a 18.800 x g por 15 min. Posteriormente a biomassa obtida foi seca em estufa de recirculação de ar a 40°C até massa constante.

Os lipídios extraídos foram quantificados conforme Bligh e Dyer [15], a partir de 0,3 g de biomassa previamente submetida à ruptura química com 5 mL de HCl 2 M a 80°C por 1 h.

2.4. Análise estatística

Os cultivos foram realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste t a 95% de confiança ($p \leq 0,05$). Para tal, foi utilizado o software *Statistica* 5.0 (Stat Soft Inc., EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento celular

A Figura 1 mostra as curvas de biomassa versus tempo de *Chaetoceros calcitrans* nos ciclos 12C:12E h e 24C:0E h, enquanto que a Tabela 1 apresenta os parâmetros de cult

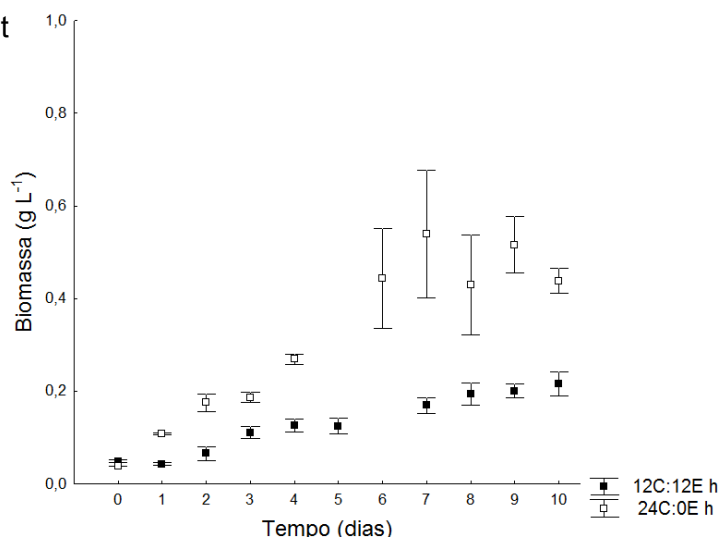


FIGURA 1. Acompanhamento da biomassa da microalga *Chaetoceros calcitrans* ao longo do cultivo autotrófico em diferentes ciclos de fotoperíodo.

De maneira geral pode-se observar que o ciclo de fotoperíodo com maior tempo de exposição à luz (24C:0E h) proporcionou melhores condições de crescimento celular para a microalga *Chaetoceros calcitrans*. Neste ciclo de fotoperíodo, a biomassa máxima foi de 0,54 g L⁻¹ no sétimo dia de cultivo. Observou-se pequena redução ao final do experimento, sendo a biomassa final de 0,44 g L⁻¹ (Figura 1 e Tabela 1). O valor de produtividade máxima foi de 0,07 g L⁻¹ no sétimo dia de cultivo e a produtividade final atingiu o valor de 0,04 g L⁻¹ dia⁻¹ (Tabela 1).

O ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h não se mostrou interessante na produção de biomassa quando comparado com o ciclo de 24C:0E h. Nesta condição de iluminação (12C:12E h) alcançou-se valores menores, quais sejam, biomassa máxima de 0,22 g L⁻¹, biomassa final de 0,22 g L⁻¹, produtividade máxima de 0,02 g L⁻¹ dia⁻¹ no décimo dia de cultivo e produtividade final de 0,01 g L⁻¹ dia⁻¹ (Figura 1 e Tabela 1).

TABELA 1. Média e desvio padrão para biomassa máxima (X_{\max}), biomassa final (X_{final}), produtividade máxima (P_{\max}) e produtividade final (P_{final}) no cultivo autotrófico da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes ciclos de fotoperíodo.

Parâmetro	Ciclo de fotoperíodo			
	12C:12E h		24C:0E h	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
X_{\max} (g L ⁻¹)	0,22 ^B	0,01	0,54 ^A	0,14
P_{\max} (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,02 ^B	0,01	0,07 ^A	0,02
X_{final} (gL ⁻¹)	0,22 ^B	0,02	0,44 ^A	0,03
P_{final} (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,01 ^B	0,01	0,04 ^A	0,01

*Letras maiúsculas diferentes para um parâmetro representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teste t entre os ciclos de fotoperíodo.

3.2. Conteúdo lipídico

A Figura 2 mostra o conteúdo lipídico para os diferentes ciclos de fotoperíodo.

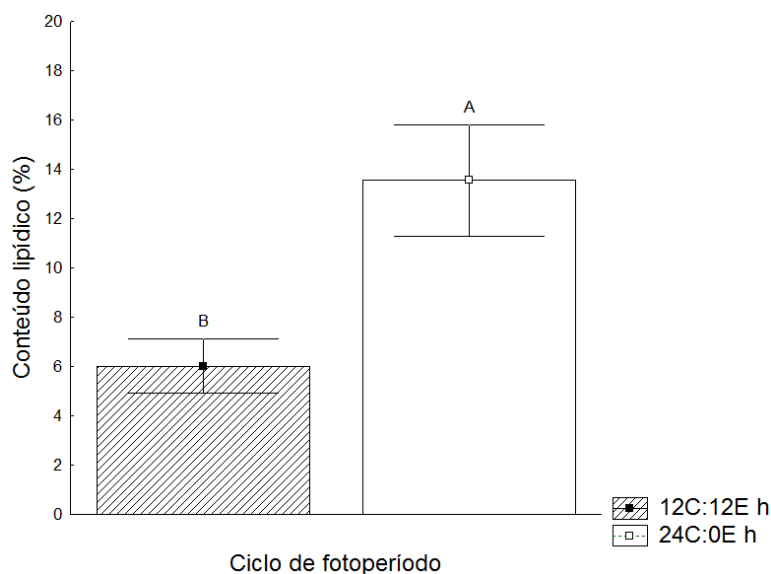


FIGURA 2. Conteúdo lipídico ao final do cultivo autotrófico da microalga *Chaetoceros calcitrans* em diferentes ciclos de fotoperíodo.

*Letras maiúsculas diferentes representam que há diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os ciclos de fotoperíodo de acordo com o teste t.

Observa-se que o ciclo de fotoperíodo de 24C:0E h proporcionou à microalga melhores condições para o acúmulo de lipídios, com 13,5%, enquanto que para o ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h foi obtido 6,0% de conteúdo lipídico. Lin e Wu [16] cultivaram a microalga *Chlorella* sp. Y8-1 durante 14 dias, à temperatura de 30°C, ciclo de fotoperíodo 24C:0E h, utilizando meio Conway modificado em cultivo autotrófico e obtiveram 0,22 g L⁻¹ de biomassa e 16,5% de conteúdo lipídico. Importante colocar que estes autores obtiveram conteúdo lipídico e biomassa próximos ao deste trabalho, porém o tempo de obtenção foi maior (14 dias). Isto deve se ao fato de que a composição, a quantidade de lipídios e o crescimento celular são dependentes da espécie de microalga utilizada e do tipo de cultivo, autotrófico ou heterotrófico [17].

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível avaliar o comportamento da microalga *Chaetoceros calcitrans* em cultivo autotrófico sob diferentes tempos de exposição à luz. O ciclo de fotoperíodo com maior tempo de exposição à luminosidade (24C:0E h)

proporcionou incrementos significativos da biomassa e do conteúdo lipídico, em comparação com o ciclo de fotoperíodo de 12C:12E h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] LV, X.; ZOU, L.; SUN, B.; WANG, J.; SUN, M.-Y. Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 391, p. 73-83, 2010.

[2] RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 189-198, 2012.

[3] JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, p. 4607-4638, 2013.

[4] CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516, 2012.

[5] WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7-11, 2013.

[6] BABUSKIN, S.; RADHAKRISHNAN, K.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1653-1660, 2014.

[7] FOO, S. C.; YUSOFF, F. M.; ISMAIL M.; BASRI. M.; CHAN, K. W.; KHONG, N. M. H.; YAU, S. K. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. **Algal Research**, v. 12, p. 26-32, 2015.

[8] SERASPE, E. B.; GABOTERO, S.; DE LA PEÑA, M. R.; PAHILA, I. G.; AMAR, E. C. Evaluation of dietary freeze-dried *Chaetoceros calcitrans* supplementation to control *Vibrio Harveyi* infection on *Penaeus monodon* juvenile. **Aquaculture**, v. 432, p. 212-216, 2014.

[9] TANTANASARIT, C.; ENGLANDE, A. J.; BABEL, S. Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 446, p. 67-75, 2013.

[10] LI, S.; XU, J.; CHEN, J.; CHEN, J.; ZHOU, C.; YAN, X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. **Aquaculture**, v. 428-429, p. 104-110, 2014.

[11] WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food**, v. 25, p. 1-53, 1966.

- [12] NOGUEIRA, D. A. **Cultivo mixotrófico de diatomáceas utilizando glicerina como fonte de carbono**. 2013. 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- [13] SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- [14] COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.
- [15] BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- [16] LIN, T.-S.; WU, J.-Y. Effect of sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 184, p.100-107, 2015.
- [17] PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F. Biodiesel renovável derivado de microalgas: Avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, p. 2013-2018, 2012.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.