

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

João Paulo Ferreira Guirado

Obtenção de ácidos graxos poli-insaturados a partir da hidrólise de
óleo microalgal

Lorena

2019

JOÃO PAULO FERREIRA GUIRADO

Estudo sobre a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados a partir da
hidrólise de óleo microalgal

Projeto de monografia apresentado à
Escola de Engenharia de Lorena -
Universidade de São Paulo como
requisito parcial para obtenção do
título de Engenheiro Químico.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia
Caroline Molgero Da Rós

Lorena

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Guirado, João Paulo Ferreira

Estudo sobre a obtenção de ácidos graxos poli
insaturados a partir da hidrólise de óleo microalgal /
João Paulo Ferreira Guirado; orientadora Prof. Dra.
Patrícia Caroline Molgero da Ros. - Lorena, 2019.
53 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Química - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2019

1. Ácidos graxos poli-insaturados. 2. Ômega-3. 3.
Ômega-6. 4. Microalgas. 5. Hidrólise. I. Título. II. da
Ros, Prof. Dra. Patrícia Caroline Molgero, orient.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Patrícia Caroline Molgero da Rós, minha orientadora, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação e condução desta monografia para conclusão do curso. Muito obrigado pela gentileza, paciência, sugestões e conselhos.

Aos meus pais, Claudene e José Antônio, os quais são pessoas muito importantes da minha vida. Muito obrigado pelo amor, carinho, educação, apoio, preocupação e pelos incentivos que me ajudam durante a universidade.

À minha irmã, Maria Angélica, pela troca de conhecimento durante a realização de nossos trabalhos finais.

À Patricia, muito obrigada pelo apoio, companheirismo, paciência, amor e pelos incentivos.

E a todos meus amigos do Centro Acadêmico (CAEQ), da república Aruera, de toda a graduação e familiares pela motivação, carinho e estímulos constantes durante toda a minha graduação.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

GUIRADO, J.P.F. **Estudo sobre a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados a partir da hidrólise de óleo microalgal.** 2019. 38 p. Projeto de Monografia (TCC) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

A demanda de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ômega 3 e ômega 6, tem aumentado cada vez mais, de forma geral por causa de seus benefícios para a saúde humana, como auxiliando na prevenção de problemas cardiovasculares e condições inflamatórias, por exemplo. Esses ácidos graxos são encontrados em animais, plantas transgênicas, fungos e em muitos microrganismos, mas são tipicamente extraídos de peixes gordurosos. Porém, recentemente, pesquisas apontam a hidrólise de óleo microalgal como uma fonte mais sustentável e menos complexa para a obtenção desses ácidos. Pois, dessa maneira, pode-se reduzir a quantidade de pescado para esse fim, visto que os estoques de peixes estão diminuindo, como também, óleos extraídos de peixes possuem aromas e substâncias que devem ser tratadas a fim de purificar e obter um melhor produto final. A produção por meio de microalgas pode ser desde pequena escala, laboratorial, como em larga escala, industrial, nesse caso necessita-se de mais estudos para viabilizar o preço final do produto para que possa ficar mais competitivo com o mercado já existente. Com base nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo sobre a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados, em especial ômega-3 e ômega-6, produzidos por microalgas. A realização deste estudo permitiu analisar e comparar dados por meio de uma revisão bibliográfica possibilitando identificar quais são as linhagens de microalgas com maior potencial para o acúmulo desses ácidos graxos e os principais fatores que influenciam a reação de hidrólise para essa finalidade. As microalgas avaliadas nesta pesquisa bibliográfica foram *Chorella vulgaris*, *Chorella minutissima*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Scenedesmus accuminatus* e *Chlorella pyrenoidosa*. De acordo com os trabalhos analisados, os teores de ácido linoléico e linolênico variaram entre 0% a 30%, e 0% a 57,23%, respectivamente, dependendo da espécie e tipo de extração de lipídeo empregada. A microalga que obteve a maior produção de ω -6 *Dunaliella salina* cultivada em um fotobiorreator do tipo fechado e a de ω -3 *Scenedesmus accuminatus* cultivada em um fotobiorreator aberto. Pela análise dos resultados ficou claro que, muitos fatores influenciam de maneira bastante significativa na obtenção desses ácidos graxos essenciais, ômega 3 e ômega 6 por microalgas.

Palavras-chave: Ácidos graxos poli-insaturados; Ômega-3; Ômega-6; Microalgas; Hidrólise.

ABSTRACT

GUIRADO, J.P.F. **Study on the use of polyunsaturated fatty acids from microalgal oil hydrolysis.** 2019. 38 p. Monograph Project (TCC) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The demand for polyunsaturated fatty acids, mainly omega-3 and omega-6, has been increasing in general because of their benefits for human health, such as helping to prevent heart problems and inflammatory conditions, for example. These fatty acids are found in animals, transgenic plants, fungi and many microorganisms, but are typically extracted from fatty fish. Recently, however, research has shown that the hydrolysis of microalgae oil is a more sustainable and less complex source of these acids. In this way, it is possible to reduce the amount of fish for this purpose, since fish stocks are decreasing, as well as oils extracted from fish have aromas and substances that must be treated in order to purify and obtain a better final product. The production by means of microalgae can be from small scale, laboratory, as well as large scale, industrial, in this case more studies are needed to make the final price of the product feasible so that it can become more competitive with the existing market. Based on this context, the present study aimed to conduct a study on obtaining polyunsaturated fatty acids, especially omega-3 and omega-6, produced by microalgae. This study made it possible to analyze and compare data by means of a bibliographic review that made it possible to identify which microalgae strains have the greatest potential for the accumulation of these fatty acids and the main factors that influence the hydrolysis reaction for this purpose. The main polyunsaturated fatty acids analyzed were linolenic and linoleic. The microalgae evaluated were *Chorella vulgaris*, *Chorella minutissima*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Scenedesmus accuminatus* and *Chlorella pyrenoidosa*. According to the studies analyzed, the levels of linoleic and linolenic acid varied from 0% to 30%, and 0% to 57.23%, respectively, depending on the species and type of lipid extraction used. The microalgae that obtained the highest production of ω -6 *Dunaliella salina* cultivated in a closed photobioreactor and that of ω -3 *Scenedesmus accuminatus* cultivated in an open photobioreactor. From the analysis of the results it was clear that many factors influence in a very significant way in obtaining these essential fatty acids, omega-3 and omega-6 by microalgae.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids; Omega-3; Omega-6; Microalgae; Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados	11
Figura 2 - Estruturas dos ácidos graxos ômega 3	12
Figura 3 - Produtos e potencial de ganho a partir de microalgas	16
Figura 4 - Representantes de microalgas com quantidades significantes de PUFA	17
Figura 5 - Tanque tipo “raceway ponds”	20
Figura 6 - Fotobiorreator em forma de tubo	22
Figura 7 - Fotobiorreator em forma de placa	22
Figura 8 - Processo de fotossíntese	25
Figura 9 - Hidrólise de triglicerídeos	29
Figura 10 - Hidrólise alcalina	30
Figura 11 - Hidrólise ácida	30
Figura 12 - Hidrólise enzimática	31
Figura 13 - Distribuição de produtos em microalgas	36
Figura 14 - Comparação entre métodos de extração	37
Figura 15 - Comparação entre BBM	41
Figura 16 - Quantidade de ômega 3 e 6 por variedade de microalga	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns produtos obtidos a partir de microalgas	15
Quadro 2 - Comparação das características de diferentes tipos de cultivos de microalgas	19
Quadro 3 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo abertos e fechados	23
Quadro 4 - Trabalhos com diferentes tipos de microalgas.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de ômega 3 e 6 para cada tipo de microalgas	35
Tabela 2 - B&D modificado com solventes orgânicos apolares (quantidade de ácido graxo $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ óleo)	38
Tabela 3 - B&D modificado com solventes próticos polares (quantidade de ácido graxo $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ óleo)	39
Tabela 4 - Análise de extração de ácidos poli-insaturados (quantidade em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ óleo)	40
Tabela 5 - Quantidade de PUFA ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de óleo)	41
Tabela 6 - Comparação dos resultados obtidos de ômega 3 e 6	43

LISTA DE SIGLAS

ω -3 – ômega 3

ω -6 – ômega 6

PUFAS - ácidos graxos poli-insaturados (Polyunsaturated Fatty Acids)

EPA – ácido eicosapentaenoico (Eicosapentaenoic Acid)

DHA - ácido docosaexaenoico (docosahexaenoic acid)

HDL - lipoproteína de alta densidade (High Density Lipoprotein)

LDL - lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Estrutura química dos ácidos ômega 3 e ômega	11
2.1.1. <i>Benefícios do ômega 3 e ômega 6</i>	<i>12</i>
2.1.2. <i>Fontes de obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (ω-3, ω-6)</i>	<i>13</i>
2.2. Microalgas	14
2.3. Formas de cultivo de microalgas	17
2.3.1. <i>Modalidades de cultivo</i>	<i>18</i>
2.3.2. <i>Regime de cultivo de microalgas</i>	<i>19</i>
2.3.3. <i>Sistema de cultivo de microalgas</i>	<i>20</i>
2.3.3.1. <i>Sistema aberto</i>	<i>20</i>
2.3.3.2. <i>Sistema fechado</i>	<i>21</i>
2.4. Fatores que interferem na produção de ômega 3 e ômega 6	23
2.4.1. <i>Temperatura</i>	<i>24</i>
2.4.2. <i>Luminosidade</i>	<i>24</i>
2.4.3. <i>Aeração e agitação</i>	<i>26</i>
2.4.4. <i>Nutrientes</i>	<i>26</i>
2.4.5. <i>pH</i>	<i>27</i>
2.5. Formas de extração de ômega 3 e ômega 6	28
2.6. Hidrólise de óleos microalgais visando obtenção de ômegas 3 e 6	29
2.6.1. <i>Mecanismos da reação de hidrólise</i>	<i>30</i>

2.7. Purificação	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

Ácidos graxos ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) são ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) componentes essenciais para o crescimento de eucariotos superiores (ADARME-VEGA et al., 2012). Os ácidos graxos ω -3 e ω -6 eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaexaenoico (DHA) proporcionam muitos benefícios a saúde e isso levou a um aumento do consumo. O mercado de ingredientes PUFA ω -3 cresceu 24,3% no ano de 2013 para 2014, o que confirma sua popularidade e consciência da população de seus benefícios (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014).

Esses ácidos graxos poli-insaturados representam um importante componente das membranas celulares humanas, particularmente das células neurais. O consumo de suplementos de EPA e DHA ajudam a prevenir problemas cardiovasculares, problemas relacionados ao sistema nervoso e condições inflamatórias. Em relação à saúde cardiovascular, o consumo regular de ω -3 pode ajudar a reduzir o risco de hipertensão, trombose, infarto do miocárdio e arritmias cardíacas. Isso ocorre porque os ácidos graxos ω -3 aumentam a proporção lipoproteína de alta densidade/lipoproteína de baixa densidade (HDL/LDL) e diminuem o colesterol total / Relação HD. Além dos benefícios cardiovasculares, os ácidos graxos ômega-3 também demonstraram efeitos sobre a função cerebral e o sistema nervoso (ADARME-VEGA et al., 2012).

Ômega-3 e ômega-6 são encontrados em animais, plantas transgênicas, fungos e muitos microrganismos, mas são tipicamente extraídos de peixes gordurosos, podendo comprometer os estoques pesqueiros globais (VARELA et al., 2013). Uma das fontes mais comuns de ω -3 e ω -6 são óleos de peixes, além de que é obtido principalmente a partir de peixes como sardinha, bacalhau, anchova, arenque, krill, galeota e variedades de crustáceos ricos em óleo. O teor de PUFAS ω -3 e ω -6 presentes nos óleos de peixe obtidos destas espécies pode variar entre 0,2 a 15% do total de ácidos graxos (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014).

A aquicultura cresce cerca de 6% ao ano. Produz atualmente 75 milhões de toneladas de frutos do mar no mundo. Os estoques globais de peixes estão em perigo, por isso, a produção dos mesmos pode diminuir em um futuro próximo; ou

seja, as práticas atuais de aquicultura permaneçam inalteradas, os estoques de peixes provavelmente estarão em perigo até 2050 (LAUBENSTEIN et al., 2019). Além disso, alguns peixes, especialmente os marinhos são às vezes contaminados com metais pesados como cobre ou mercúrio, e poluentes orgânicos ou dioxinas, que têm um efeito tóxico para a saúde humana. Os benefícios dos peixes como fonte de ômega-3 são questionados, por essa razão, e várias fontes alternativas para obtenção desses ácidos graxos essenciais têm sido propostas, dentre as quais se destacam as microalgas (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2010).

A denominação microalgas inclui organismos com estrutura celular eucariótica. Elas crescem em sistema autotrófico quando utilizam luz e dióxido de carbono, como também podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, usando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico. No sistema mixotrófico utilizam-se, simultaneamente, a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono (EZE et al., 2018).

O crescimento de microalgas é resultado da interação entre fatores químicos, físicos e biológicos. A composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie, de fatores como a intensidade de luz, concentração de CO₂, pH, nutrientes e temperatura (LAMARCA et al., 2009).

Os PUFAS de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais. Lipídeos, especialmente ácidos graxos insaturados, têm sido encapsulados visando diminuir a susceptibilidade à oxidação (ADARME-VEGA et al., 2012).

Com base nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo sobre a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados, em especial ômega-3 e ômega-6, produzidos por microalgas. A realização deste estudo permitiu analisar e comparar dados por meio de uma revisão bibliográfica possibilitando identificar quais são as melhores microalgas e métodos de obtenção desses ácidos graxos a partir das espécies estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

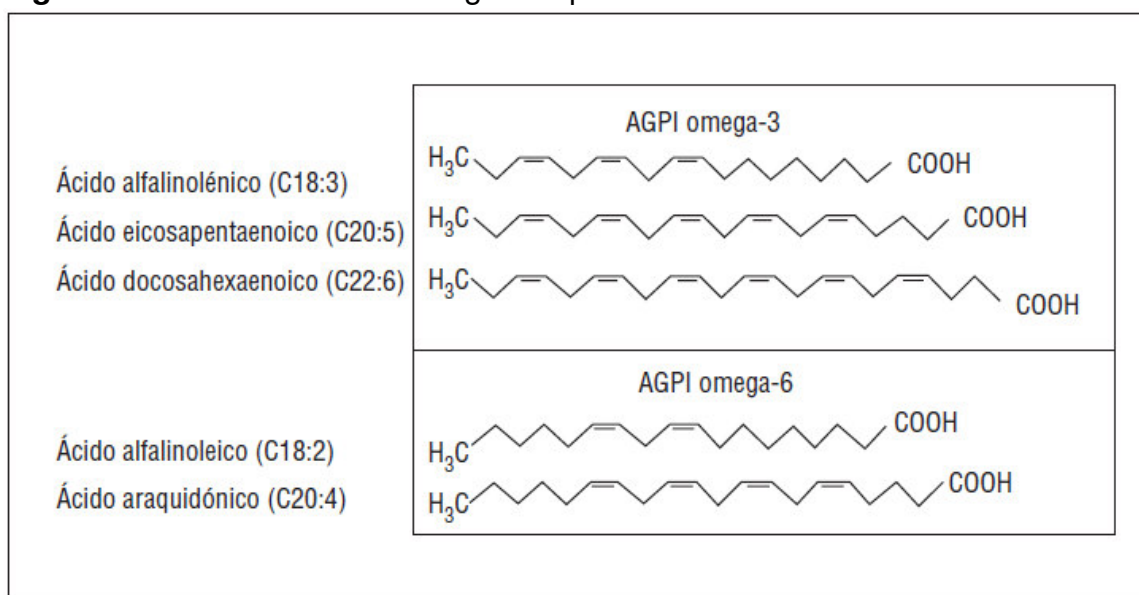
2.1. Estrutura química dos ácidos ômega 3 e ômega 6

Compostos conhecidos por ômega 3 são ácidos carboxílicos poli-insaturados (apresentam várias duplas ou triplas ligações entre átomos de carbono), sendo que a primeira dupla ligação aparece a partir do terceiro carbono a contar da extremidade oposta do grupamento carboxílico. São ácidos graxos (com elevado número de carbonos), cuja fórmula contendo apenas uma insaturação seria $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, em que n , quase sempre, é um número ímpar, de forma que a molécula possua um número par de carbonos na cadeia (IYENGAR, 2004). São exemplos de compostos dessa natureza o ácido alfa-linolênico e o ácido docosaexaenóico. Muitos compostos dessa natureza são considerados essenciais, uma vez que não são produzidos pelo organismo (de forma endógena), carecendo a sua ingestão (exógena).

Os ácidos do tipo ômega 6 constituem uma família de ácidos graxos insaturados que possuem em comum uma terminação ligação entre carbonos na posição 6, ou seja, no sexto carbono a partir da posição metil (GONZÁLEZ et al., 2017).

As estruturas químicas planas desses ácidos graxos poli-insaturados estão representadas na Figura 1.

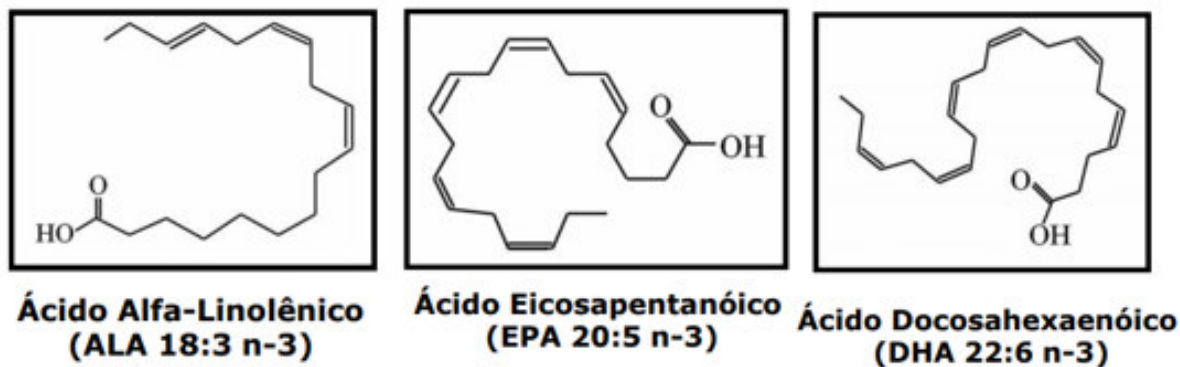
Figura 1 – Estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados.



FONTE: (CABALLERO et al., 2006)

Como as insaturações não permitem que a estrutura química da molécula fique de maneira linear, a Figura 2 mostra a forma mais apropriada das estruturas de ômega 3.

Figura 2 – Estruturas dos ácidos graxos ômega 3



FONTE: (WIJENDRAN; HAYES, 2004)

2.1.1. Benefícios do ômega 3 e ômega 6

A ingestão de ômega 3 e ômega 6 é necessária e traz muitos benefícios para a saúde dos seres humanos, dentre os quais podem se destacar: modificação da composição química do sangue, resultando no aumento dos níveis do colesterol HDL (colesterol bom) e a diminuição dos níveis de colesterol LDL (colesterol ruim) (CALDER, 2015); prevenção na formação das placas de gordura nas paredes das artérias, além de garantir uma maior flexibilidade das mesmas (RUXTON et al., 2007); participação do recobrimento da retina; ação anti-inflamatória (CALDER, 2015), dentre outras.

Existem dois períodos críticos durante o desenvolvimento fetal nos quais os PUFAS são extremamente importantes: o período fetal e o período que vai do nascimento até o término do desenvolvimento bioquímico completo do cérebro e da retina, que em humanos ocorre aos 2 anos de idade. Esses ácidos graxos são componentes estruturais das membranas dos fosfolípidos dos tecidos do corpo, estando presentes em níveis especialmente altos na retina e cérebro, nos quais o DHA constitui mais de 35% do total 8 dos ácidos (LIMA et al, 2004).

No sistema cardiovascular, o ômega 3 age de duas maneiras para proporcionar benefícios. O EPA regula a atividade das plaquetas sanguíneas, evitando coágulos de sangue, que podem levar a um acidente vascular cerebral ou infarto. O EPA também reduz os níveis de triacilgliceróis, um tipo de gordura que é ruim para o organismo quando está elevada. Já o DHA ajuda a evitar arritmias cardíacas, estabilizando a atividade elétrica no coração (CONNOR; CONNOR, 2000).

Com relação a parte neural do corpo, esses ácidos graxos agem na formação da bainha de mielina, um componente dos neurônios. Assim, ocorre a melhora do desempenho cognitivo, da atividade cerebral e comunicação entre as células do cérebro. O ácido graxo também conta com efeito vasodilatador e por isso ocorre o aumento do aporte de oxigênio e nutrientes (TAMARA et al., 2017).

2.1.2. Fontes de obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (ω -3, ω -6)

A fonte mais comum de PUFAS são os peixes, principalmente o bacalhau, sardinha, arenque, anchova, galeota, krill e outras variedades de crustáceos ricos em óleo. Óleo de peixe obtido destas espécies são ricos em ambos os PUFAS, EPA e DHA que variam de 0,2 a 15% do total de ácidos graxos. EPA e DHA também são encontrados em águas subterrâneas e crustáceos, como mexilhões, ostras, camarão, vieiras, caranguejos e amêijoas (0,1 - 2,5%) (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014).

A presença de produtos químicos contaminantes (por exemplo, mercúrio) no óleo de peixe pode ser prejudicial aos consumidores. Além disso, o óleo de peixe não é adequado para pessoas que utilizam de uma dieta vegana e o odor o tornam pouco atraente (ADARME-VEGA et al., 2012).

Existem uma variedade de fontes alternativas de EPA e DHA, como bactérias, fungos, plantas e microalgas que estão atualmente sendo exploradas para produção comercial desses ácidos graxos essenciais.

As microalgas oferecem um recurso promissor para essa finalidade, utilizando a biotecnologia e bioengenharia para a produção de PUFAS, como uma alternativa aos óleos de peixe. Em comparação com plantas de culturas terrestres, as microalgas apresentam algumas vantagens, tais como genes que ocorrem

comumente para a biossíntese desses nutrientes, perfis de ácidos graxos mais simples e maiores taxas de crescimento (VARELA et al., 2013). O interesse pelo lipídio de algas surge principalmente do fato de que organismos são capazes de sintetizar quantidades consideráveis de PUFAS e pode alcançar os seres humanos através da cadeia alimentar ou podem ser utilizados como suplementos alimentares (AGGELIS et al., 2014).

2.2. Microalgas

Microalgas são microrganismos predominantemente aquáticos e, geralmente, microscópicos unicelulares, eucariontes, que podem formar colônias, com pouca ou nenhuma diferenciação celular além de serem dotados de pigmentos, responsáveis por coloração variada e por metabolismo fotoautotrófico (RAY; SUSAN, 2014).

As microalgas possuem grande importância, tanto biológica, quanto ecológica e econômica. O valor deste grupo de organismos reside na estruturação da atual atmosfera terrestre, possibilitando a vida sobre a superfície da Terra dos seres vivos aeróbicos, em termos biológicos. Ao passo que o fato de se constituírem em produtores primários atribui às algas a importância ecológica na medida em que estas sustentam a vida nos mares e oceanos desempenhando, assim, um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas. Por outro lado, a importância econômica é determinada pela diversidade de usos das algas em vários países no mundo, que compreendem as indústrias alimentícias, de medicamentos, de imunoestimulantes, biocombustíveis, cosmética e agricultura (BARCELLOS et al., 2012).

Esses microrganismos tem sido uma fonte alternativa para a produção de ácidos graxos. O conteúdo de lipídeos da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco da célula e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BIANCHINI et al., 2006). As microalgas produzem não somente ácidos graxos como diversos outros produtos, conforme pode ser visualizado no Quadro 1, juntamente com suas principais aplicações.

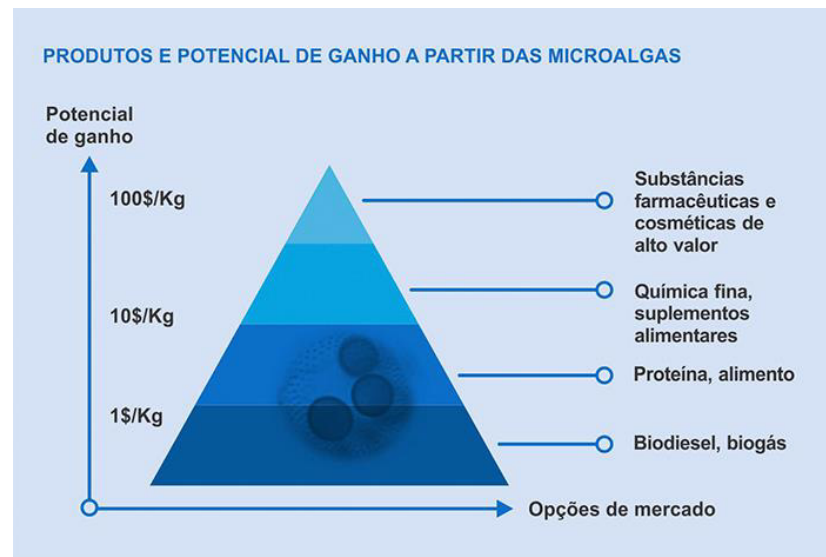
Quadro 1 – Alguns produtos obtidos a partir de microalgas

	Produtos	Aplicações
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais “health food” Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura Condicionador do solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas Luteína Beta-caroteno Vitamina C e E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos Graxos	Ácido araquidônico – ARA Ácido eicosapentaenoico – EPA Ácido docosahexaenóico – DHA Ácido gama-linoleico – GCA Ácido linoleico – LA	Aditivos alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase – SOD Fosfoglicerato quinase – PGK Luciferase e Luciferina Enzima de restrição	Alimentos naturais Pesquisa Medicina
Polímeros	Polissacarídeos Amido Ácido poli-beta-hidroxibutirico - PHB Peptídeos	Aditivos alimentares Cosméticos Medicina
Produtos especiais	Toxinas Isótopos Aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico) Esteroides	Pesquisa Medicina

FONTE:(BIANCHINI et al., 2006)

A Figura 3 apresenta o potencial de ganho dos produtos a partir de microalgas.

Figura 3 – Produtos e potencial de ganho a partir de microalgas

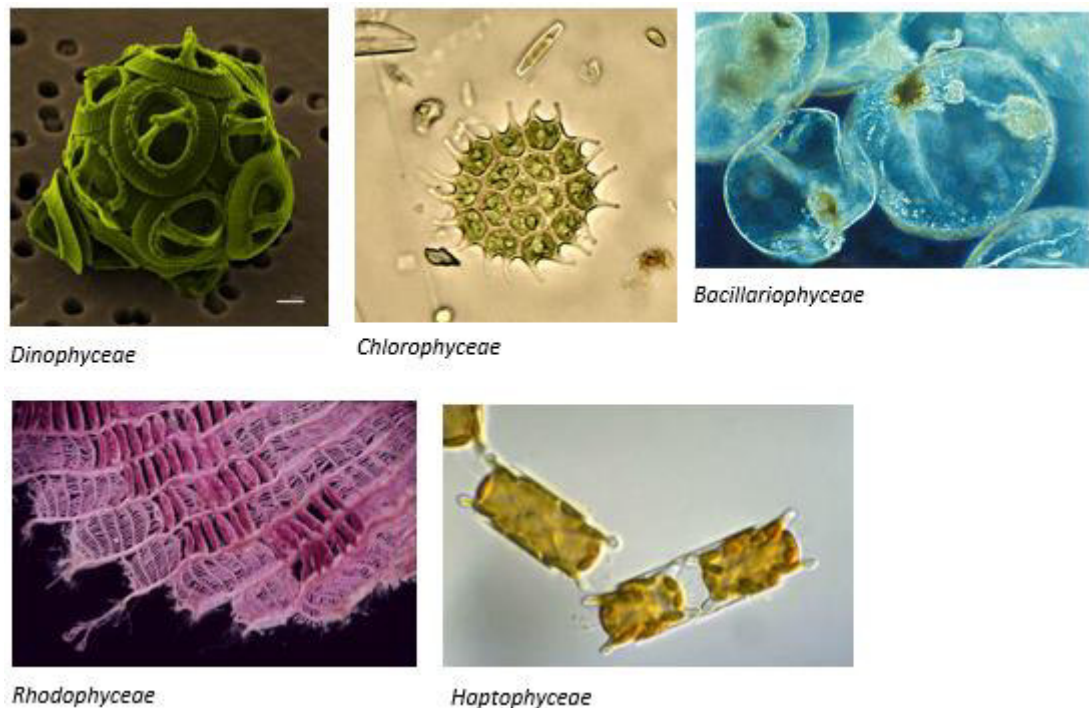


Fonte: (SOUZA, 2015)

Dentre as espécies conhecidas de microalgas que apresentam quantidades significativas de PUFAS das famílias Ômega-3 e Ômega-6, encontram-se as representantes de Haptophyceae (*Isochrysis* sp. e *Pavlova lutheri* (Droop) Green), Bacillariophyceae (*Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira* sp. e *Odontella aurita* (Lyngbye) Agardh), Dinophyceae (*Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornick), Rhodophyceae (*Porphyridium cruentum* Nägeli) e, em menor quantidade, de Chlorophyceae (HATHERLY, 2011).

A Figura 4 ilustra representantes de Haptophyceae, Bacillariophyceae, Dinophyceae, Rhodophyceae e Chlorophyceae.

Figura 4 – Representantes de microalgas com quantidades significantes de PUFA



FONTE: (MARIA, 2012)

2.3. Formas de cultivo de microalgas

As microalgas necessitam de uma fonte de energia, que pode ser do tipo luminosa para o crescimento autotrófico ou um composto orgânico para o crescimento heterotrófico (BA et al., 2013).

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Quanto aos fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie

cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal (GRESSLER, 2011).

2.3.1. Modalidades de cultivo

As microalgas podem ser cultivadas nos modos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, sendo que a diferença entre estas modalidades de cultivo está na fonte de energia e de carbono. No cultivo autotrófico, mais especificamente, fotoautotrófico, as células obtêm energia da luz e o carbono do CO₂ do ar, produzindo então, através da fotossíntese, suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. No cultivo heterotrófico, as células utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono (melaço, glicose, glicerol e ureia) e, no mixotrófico, usam a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO₂ e compostos orgânicos como fonte de carbono (BA et al., 2013).

A maioria dos processos de produção de EPA investigados são baseados em crescimento fotoautotrófico. No entanto, o crescimento autotrófico pode ser limitado devido à insuficiência de luz (fotolimitação) causada pelo sombreamento das próprias células. Consequentemente, a produtividade e o rendimento do EPA de sistemas fotossintéticos são baixos (ADARME-VEGA et al., 2012). Para aumentar a produção de EPA por culturas de microalgas, é desejável um processo de crescimento heterotrófico. Um dos principais fatores que influenciam o conteúdo lipídico e de PUFAS em microalgas em termos nutricionais é a concentração de CO₂. As microalgas utilizam carbono inorgânico para o crescimento, podendo ser utilizadas na mitigação de CO₂ mais eficaz do que vegetais superiores (BORODYANSKI; YANTOVSKI; LEVIN, 1993).

No cultivo autotrófico, apesar de sua alta eficiência em utilizar a luz, as microalgas apresentam um crescimento lento devido à limitação de luz em condições de larga escala, quando se alcançam altas densidades de células, ou “fotoinibição” devido à luz excessiva. O crescimento heterotrófico, por outro lado, elimina o requerimento por luz e oferece a possibilidade de aumentar

significativamente a concentração celular e a produtividade de biomassa em larga escala (BA et al., 2013).

Uma alternativa à produção fotoautotrófica de microalgas é o cultivo mixotrófico. Nesse caso, o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO₂ atmosférico (CO₂ inorgânico) (GRESSLER, 2011). O Quadro 2 mostra a comparação entre as três modalidades de cultivo.

Quadro 2 - Comparação das características de diferentes tipos de cultivos de microalgas.

	Fototrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
Fonte de energia	Luz	Orgânica	Luz e orgânica
Densidade celular	Inorgânica	Orgânica	Inorgânica e orgânica
Tipo de reator	Aberto ou fotobioreator	Fermentador convencional	Fotobioreator fechado
Custo	Baixo	Alto	Médio
Principais desvantagens	Baixa densidade Contaminação em sistema aberto	Alto custo de substrato Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação

FONTE: (Hakalin, 2014)

2.3.2. Regime de cultivo de microalgas

As três formas básicas de operação de sistemas de cultivos de microalgas são: batelada, semi-contínuo e contínuo, conforme detalhes de cada um deles são descritos a seguir.

Nos cultivos em batelada ou tanque, as células de microalgas são inoculadas ao meio de cultivo e após inoculação não ocorre adição de nutrientes ao longo do desenvolvimento da cultura. O cultivo é encerrado quando os nutrientes da cultura se esgotam ou quando o produto desejado for produzido. Este tipo de cultivo caracteriza-se por apresentar fases distintas de crescimento. A duração de cada fase não é fixa, ela depende basicamente de fatores como a espécie cultivada e as condições de cultivo oferecidas (PETER; PATRICK, 1994).

No cultivo semi-contínuo, um volume conhecido de cultura microalgal é removido, periodicamente, e substituído por meio de cultivo novo. Neste tipo de

cultivo, as células tendem a sofrer poucas alterações ao longo do tempo (pois elas permanecem em condições de crescimento sem fatores limitantes), ao contrário do que acontece em cultivos estanques (DINIARA, 2010).

No cultivo contínuo, um fluxo constante de cultura microalgal é removido do biorreator simultaneamente com a entrada de meio de cultivo fresco. As taxas de crescimento são reguladas e a densidade celular é controlada automaticamente por sensores ópticos. A concentração de células e nutrientes é mantida constante e o cultivo atinge estado estacionário. O cultivo pode permanecer em estado estacionário por um período prolongado, conseqüentemente, são produzidas grandes quantidades de células de alta qualidade e homogeneidade. No entanto, o cultivo contínuo tem um custo elevado devido à necessidade de automação e condições de temperatura e iluminação constantes (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

2.3.3. Sistema de cultivo de microalgas

Os sistemas de cultivos de microalgas podem ser de duas maneiras: aberto ou fechado. Para cada tipo de sistema existem fotobiorreatores e condições de cultivo diferentes.

2.3.3.1. Sistema aberto

Grande parte dos cultivos de microalgas tem sido realizada em tanques abertos e lagoas que utilizam a luz solar e o CO₂ da atmosfera. Os tanques oferecem muitas vantagens, pois podem ser construídos e explorados a baixos custos, desde que sejam utilizadas espécies adequadas para este tipo de cultivo. Entre os sistemas abertos, os mais utilizados são os tanques circulares, com agitação por meio de pás ou borbulhamento e do tipo “*raceway ponds*”, que consiste em tanques rasos com pás que promovem a circulação do cultivo, conforme mostra a Figura 5 (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Figura 5 – Tanque tipo “raceway ponds”



FONTE:(UBRABIO, 2015)

Uma gama muito ampla de materiais pode ser empregada, pelo fato de nenhum material transparente ser necessário na construção de tanques abertos. Esses tanques são também de manutenção relativamente fácil, uma vez que se tem acesso livre para realizar a limpeza do biofilme que se acumula sobre as superfícies. A principal desvantagem dos sistemas abertos é que ocorre evaporação da água a uma taxa similar às culturas terrestres e, também, são mais suscetíveis à contaminação por espécies indesejáveis. Inicia-se o cultivo com uma espécie que é inoculada no tanque, mas ao longo do tempo espécies indesejáveis são inevitavelmente introduzidas e podem reduzir severamente o rendimento e até mesmo superar as espécies inoculadas, pois, uma vez que um concorrente importante tiver estabelecido residência no tanque, torna-se extremamente difícil erradicá-lo, por isso faz-se necessário redobrar a atenção quando essas espécies indesejáveis surgem (BIANCHINI et al., 2006).

2.3.3.2. Sistema fechado

O termo “fechado” diz respeito ao menor contato com o ambiente externo que estes sistemas apresentam em relação aos tanques. Os sistemas fechados são comumente denominados fotobiorreatores e geralmente são utilizados para produção em larga escala, gerando produtos de alto valor comercial. A vantagem

comparativa destes sistemas em relação aos sistemas abertos é a obtenção de maiores produtividades de biomassa microalgal, bem como a possibilidade de maior controle das condições de cultivo (MUÑOZ, 2005).

Os fotobiorreatores são classificados em “tubulares” e “planares”, de acordo com a geometria do compartimento que encerra a cultura. Assim, são constituídos de tubos ou placas de material transparente à luz visível (MUÑOZ, 2005). A Figura 6 ilustra os fotobiorreatores em forma de tubo e a Figura 7 fotobiorreatores em forma de placas.

Figura 6 – Fotobiorreator em forma de tubo.



FONTE: (LUIS; PALOMINO, 2017)

Figura 7 – Fotobiorreator em forma de placa.



FONTE: (LUIS; PALOMINO, 2017)

Nestes sistemas, o controle das condições de cultivo é mais fácil e o potencial de contaminação é menor em comparação com os sistemas abertos, como resultado da menor exposição da cultura ao ambiente. As placas e os tubos são confeccionados de maneira que o caminho óptico seja menor em comparação àquele dos tanques, promovendo uma melhor distribuição da luz e, por conseguinte, uma maior produtividade em biomassa. Contudo, os custos de implementação e de operação destes sistemas são superiores aos dos tanques (MCCARTHY et al., 2006). O Quadro 3 mostra as principais vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo abertos e fechados.

Quadro 3—Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo abertos e fechados

Parâmetros	Tanques (raceway)	Sistemas fechados
Espaço requerido	Muito	Pouco
Risco de contaminação	Alto	Médio a baixo
Perdas de água	Alto	Baixo
Concentração de oxigênio	Usualmente baixa	Deve ser removido continuamente
CO ₂ -perdas	Alto	Quase nenhuma
Reprodutibilidade da produção	Variável, mas consistente	Possível dentro de determinadas tolerâncias
Controle de processo	Limitado	Possível
Desgaste do material de construção	Baixo	Usualmente alto
Dependência de condições climáticas	Alto	Menor, por ser protegido
Temperatura	Variável	Necessário resfriamento
Custo de colheita	Alto	Médio
Manutenção	Fácil	Difícil
Custo de construção	Médio	Alto
Concentrações de biomassa na colheita	Baixo	Alto

FONTE:(BA et al., 2013)

2.4. Fatores que interferem na produção de ômega 3 e ômega 6

Independente do sistema utilizado para cultivar microalgas, diversos fatores podem influenciar na concentração e composição da biomassa microalgal, dentre eles os biológicos, físicos e químicos.

Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Com relação aos fatores físico-químicos, estes dizem respeito principalmente à temperatura, iluminação e pH, regime hidrodinâmico e disponibilidade de nutrientes (Oliveira, 2013).

2.4.1. Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos. Há perigo em se fazer generalizações da temperatura, pois ainda que pertencentes à mesma região ela varia de espécie para espécie. A temperatura ideal para os cultivos de microalgas, de modo geral, está entre 20 e 24 °C, variando em função da espécie utilizada. Temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam mais estabilidade nos experimentos e nas operações de rotinas, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. Para salas de cultivos, temperaturas constantes são alcançadas por meio de sistemas de refrigeração, porém, para grandes sistemas a dificuldade de se manter a temperatura constante é maior (LOURENCO, 2006).

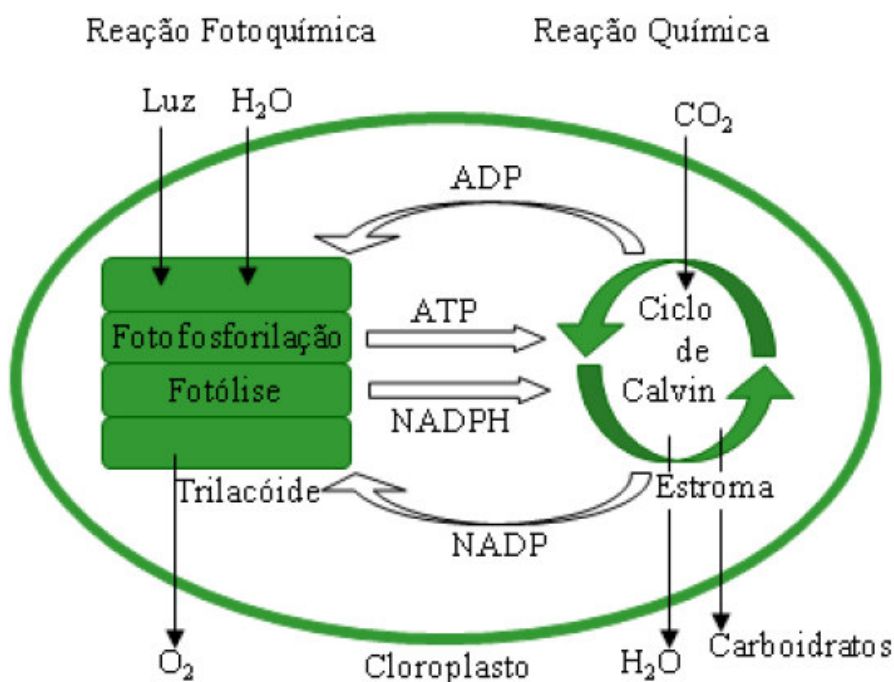
A temperatura de cultivo é tida como influente também no conteúdo celular das quotas de carbono e nitrogênio, bem como no volume celular de modo que a temperatura ótima para o crescimento pode acarretar células com tamanho, volume celular de carbono e nitrogênio reduzido. Em outras palavras, é necessário mais nutrientes e carbono para produzir uma célula com a mesma taxa de crescimento que em uma temperatura fora do ótimo fisiológico (GOLDMAN; CARPENTER, 1974).

2.4.2. Luminosidade

O efeito da intensidade da luz (irradiância ou iluminação) nos cultivos de microalgas tem sido estudado em detalhes. É através da fotossíntese que as microalgas clorofíceas fixam o carbono necessário para a produção de biomassa, logo a relação entre a síntese de material orgânico como reflexo da produção fotossintética pode ser expressa principalmente pelo incremento da população algal (GRESSLER, 2011).

Um dos principais fatores para o desenvolvimento das algas é a condição da luz. A variação da luz tanto no espaço (profundidade e latitude) quanto no tempo (diariamente e sazonalmente), influencia o tamanho da população. A luz utilizada pelas algas fotossintetizantes encontra-se na faixa espectral da radiação solar de 400 a 700 nm, que corresponde à radiação fotossinteticamente ativa. Em cultivos de pequena escala, recomenda-se o uso de luz artificial, uma vez que pode ser controlada de acordo com as necessidades das culturas. As lâmpadas mais comumente utilizadas são fluorescentes do tipo luz do dia, por simular comprimentos de ondas necessários para a fotossíntese (Oliveira, 2013). A Figura 8 ilustra o processo de fotossíntese.

Figura 8 – Processo de fotossíntese



FONTE:(SÔNIA, 2005)

A luz é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (unidades fotossintéticas). Esses pigmentos são classificados em três grupos: as clorofilas, os carotenóides e as ficolibinas, sendo que cada um difere em sua composição química e apresenta diferente capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda (SÔNIA, 2005).

2.4.3. Aeração e agitação

A aeração está diretamente ligada à demanda de carbono, pois na formulação de quase todos os meios de cultivo não há adição de fonte de carbono. A aeração também promove a agitação dos cultivos, permitindo a homogeneização, mesmo para espécies móveis pode haver a decantação e acúmulo das células junto ao fundo do reator (LOURENCO, 2006). A agitação que promove a mistura da suspensão microalgal é um fator de extrema importância pelo fato de que possibilita o acesso das células à luz, auxilia a troca de gases, diminui o efeito da estratificação térmica bem como propicia melhor distribuição dos nutrientes. Todos estes fatores tem influência na produtividade de ômega 3 e ômega 6 (SOARES, 2010).

Nos fotobiorreatores tubulares, o processo de mistura da suspensão microalgal é realizado por bombas mecânicas (centrífuga, excêntrica, deslocamento positivo volumétrica, parafuso, peristáltica) ou por borbulhamento de ar. A agitação nos fotobiorreatores faz referência ao perfil hidrodinâmico do cultivo, que caracteriza o regime de escoamento da suspensão (Oliveira, 2013).

A otimização da produtividade dos ácidos poli-insaturados microalgal requer um fluxo turbulento. No entanto, um fluxo turbulento muito alto produzido pelo bombeamento pode causar um estresse hidrodinâmico, que resulta em dano celular. Os principais fatores que estão relacionados ao estresse hidrodinâmico são: o tipo de bomba envolvida; a morfologia celular, geometria do fotobiorreator, que determina a frequência da passagem das células em suspensão pela bomba; e as condições fisiológicas das células (SUKLA et al., 1990).

2.4.4. Nutrientes

O crescimento das microalgas e a quantidade de lipídeos produzidos pelas células estão ligados à quantidade de nutrientes disponível no meio de cultivo. Para o crescimento ótimo das espécies, é necessária uma série de nutrientes, destacando que dependendo das espécies, ocorrem variações relacionadas principalmente à quantidade dos nutrientes no meio. Mesmo assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais (HATHERLY, 2011).

Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), fósforo (P) e hidrogênio (H), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e enxofre (S). Como micronutrientes, geralmente requerem ferro (Fe), cobre (Cu), manganês (Mn), cobalto (Co) e molibdênio (Mo), sendo que algumas espécies de microalgas também necessitam de baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura. Os principais elementos limitantes do crescimento são o carbono, nitrogênio, o fósforo e o ferro (RICHMOND, 2007).

Existem vários estudos sobre cultivos de microalgas em meios com as mais diversas características, principalmente em relação à privação de determinados nutrientes e seus efeitos no aparato fotossintético. Porém, em relação à característica do meio e a produção de ômega 3 e ômega 6, a literatura torna-se limitada, desse modo as informações que seguem são generalizadas para todas as microalgas (Oliveira, 2013).

O carbono, por ser o componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídeos, entre outros), é o elemento necessário em maiores concentrações para as algas, a proporção do consumo de carbono, nitrogênio e fósforo é de 106:16:1, para algumas algas marinhas. Dependendo da velocidade de crescimento das microalgas, pode ocorrer um rápido consumo do carbono disponível, tornando-se um fator limitante da multiplicação celular, além da significativa elevação do pH do cultivo para valores superiores a 9, caso o meio de cultivo não seja tamponado (LOURENCO, 2006).

2.4.5. pH

O pH afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos, que podem cristalizar e precipitar. Desse modo, o pH deve ser quase neutro para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (BASRI, 2016) .

O consumo das formas inorgânicas de carbono pelas algas eleva o pH, devido ao fato do aparato fotossintético destes organismos transportar íons hidróxido para o exterior da célula, reação catalisada pela enzima anidrase

carbônica, associado à captação de íons H^+ para o interior das membranas tilacóides (GRESSLER et al., 2008) .

O crescimento da microalga envolve o consumo do CO_2 dissolvido no meio, acarretando a elevação do pH (> 10). Assim como o aumento da disponibilidade de CO_2 , excesso do mesmo, pode reduzir o pH (<5) e consequentemente inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES et al., 2012).

O uso de tampões permite uma variação discreta no pH (0,3), por outro lado para sistemas de produção de microalgas de grande escala o uso de tampões aumenta o custo da produção. Uma forma de regular as variações de pH é a aeração dos cultivos, com bombeamento de ar atmosférico (0,03% de CO_2) ou com ar enriquecido de CO_2 , em concentração ideal para a espécie cultivada (AMANDA, 2013).

2.5. Extração de lipídeos

Após a colheita e recuperação da biomassa, é necessário realizar a extração dos lipídeos acumulados no interior das células microalgais. A eficácia das técnicas de colheita e extração depende das características físicas da cepa de microalgas, como o tamanho da célula, composição da parede celular, dentre outras (ADARME-VEGA et al., 2012).

Diversos métodos tem sido utilizados para extração de lipídeos a partir da biomassa de microalgas, dentre os quais podem se destacar a extração por prensagem, por solvente, por choque osmótico e extração enzimática.

Um dos métodos mais antigos e mais simples é o método de extração por prensagem, sendo que se utiliza da força mecânica para romper as células. Com a utilização desse método consegue-se extrair até 75% do óleo presente no interior das células (BIANCA, 2016). A prensa de rosca é muito utilizada para esta finalidade.

O método de extração por solventes é um dos mais rápidos, além de muito eficiente e não degradar os lipídeos extraídos. Quando esse método é aplicado é importante que o solvente seja de baixo custo, volátil, de baixa toxicidade e seletivo.

Alguns dos solventes mais utilizados para esta finalidade são o clorofórmio, acetona, metanol e hexano (VIÊGAS, 2010).

A extração por choque osmótico é baseada na ruptura da célula por brusca redução da pressão osmótica, utilizada para microrganismos com parede celular espessa. A diferença de pressão osmótica pode ser realizada pela adição a 10% de NaCl ao meio tornando o meio externo hiperconcentrado (ONAY et al., 2016).

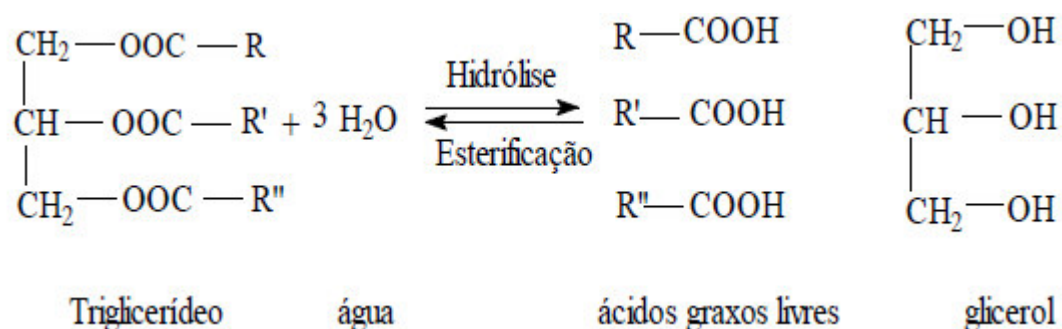
O processo de extração utilizando enzimas para obtenção de óleos microbianos ou vegetais é utilizado principalmente para aumentar o rendimento de obtenção de ômega 3 e 6, fornecendo melhores resultados quando aplicado simultaneamente com processos mecânicos (SANTOS; FERRARI, 2006).

2.6. Hidrólise de óleos microalgais visando obtenção de ômega 3 e 6

Na hidrólise de óleos e gorduras é a maneira mais utilizada para se obter ácidos graxos livres, os quais podem ser classificados em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, dependendo da presença e número de insaturações na cadeia dos ácidos graxos (BUENO, 2005).

As moléculas de triacilglicerol, em presença de água e catalisador são hidrolisadas, liberando ácidos graxos livres e glicerol. Os catalisadores utilizados nesse tipo de reação podem ser ácidos (ácidos sulfônicos aromáticos), bases (ZnO, MgO, CaO) ou enzimas lipolíticas, lipases (ONAY et al., 2016). A hidrólise dos triacilgliceróis pode ser visualizada na Figura 9.

Figura 9 – Hidrólise de triacilgliceróis



Fonte: (BUENO, 2005)

Dentre os principais fatores que afetam a velocidade dessas reações encontram-se a temperatura, tipo de catalisador, teor de água no meio reacional e

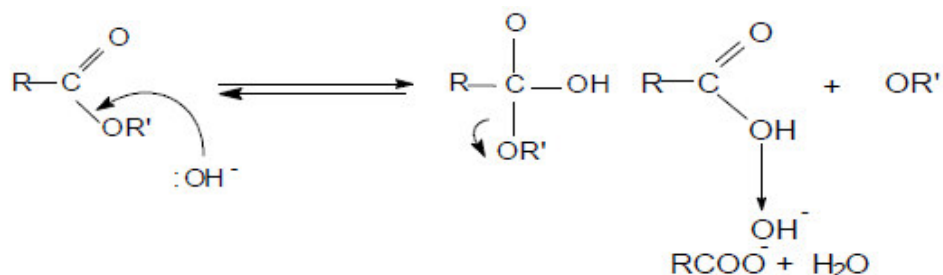
a concentração de glicerol liberado na fase aquosa. A reação ocorre em vários estágios que acontecem simultaneamente e em velocidades diferentes (BUENO, 2005). Geralmente, nas indústrias de óleos são utilizados catalisadores químicos inorgânicos, temperaturas de 100 a 280 °C e pressões elevadas (700 psi).

Enquanto a hidrólise química necessita de elevadas temperaturas e pressões a hidrólise enzimática pode ser realizada em condições amenas (30 a 40 °C e pressão atmosférica), diminuindo dessa maneira o gasto energético em comparação aos processos químicos convencionais.

2.6.1 Mecanismos da reação de hidrólise

A hidrólise alcalina, o íon hidróxido atua como nucleófilo e o mecanismo é de substituição nucleofílica (HIJAZIN; SIMÕES; SILVEIRA, 2010), conforme esquematizado na Figura 10.

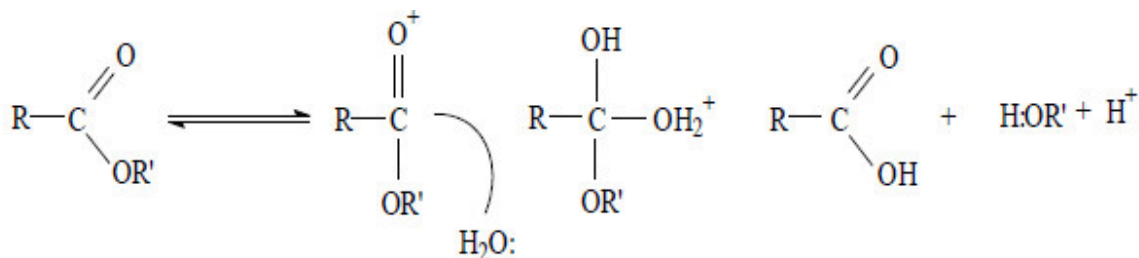
Figura 10 - Hidrólise alcalina



Fonte: (FRANCISCO; ANDRÉ; GILBERLANDIO, 2017)

Na hidrólise ácida, o mecanismo é basicamente o mesmo sendo que os prótons se ligam ao oxigênio da carbonila e tornam a molécula vulnerável ao ataque nucleofílico pela água (HIJAZIN; SIMÕES; SILVEIRA, 2010) como ilustra a Figura 11.

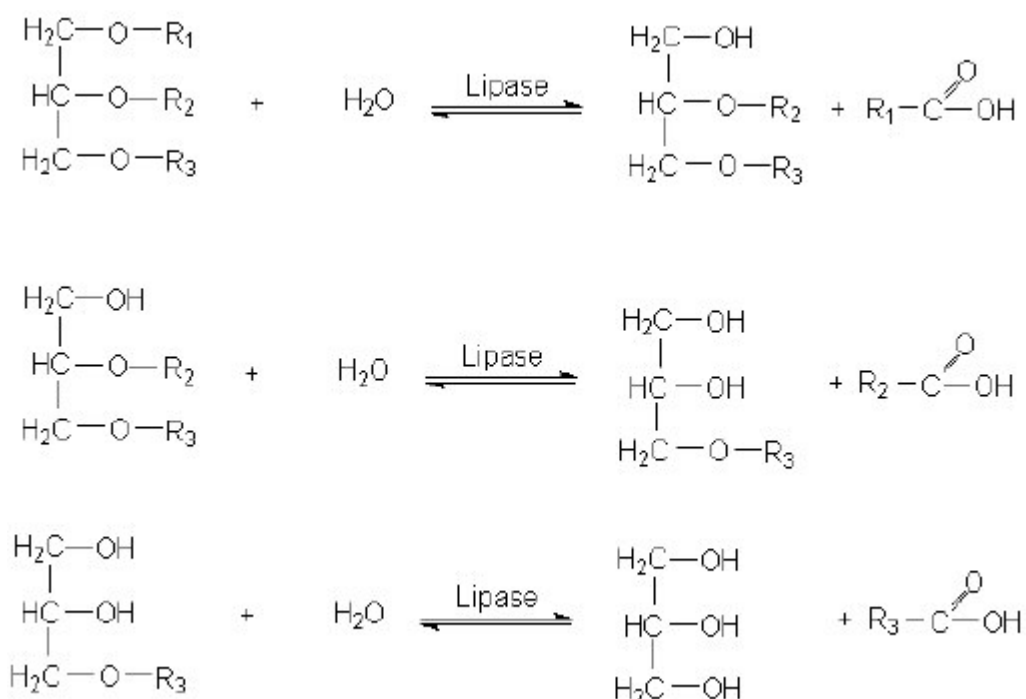
Figura 11 - Hidrólise ácida



Fonte:(BUENO, 2005)

A hidrólise enzimática de triglicerídeos ocorre por clivagem seqüencial dos grupos acila no triglicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeos, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (HIJAZIN; SIMÕES; SILVEIRA, 2010) conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Hidrólise enzimática



Fonte: (BUENO, 2005)

2.7. Purificação dos produtos obtidos das reações de hidrólise

A separação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise, pode ser realizada por meio de processos físicos de separação por destilação simples ou fracionada, solidificação e prensagem, cristalização fracionada direta ou por solventes (GUNSTONE, 2002).

A purificação, em escala de laboratório, geralmente é efetuada por adição de solventes polares como clorofórmio ou diclometano. Na fase aquosa encontram-se o glicerol, os diglicerídeos e monoglicerídeos, enquanto na fase orgânica os

ácidos graxos. A quantificação dessas frações são variadas e pode ser efetuada por cromatografia de fase gasosa (BUENO, 2005).

Com a cromatografia de fase gasosa separa-se os componentes voláteis de uma mistura, de acordo com suas tendências relativas entre adsorver-se, volatilizar-se e mover-se do material inerte através da coluna cromatográfica, carregados por um gás inerte. Usando-se esta técnica, misturas de ácidos graxos com vários comprimentos de cadeia e vários graus de insaturação, podem ser completamente separadas e quantificadas (RIZVI, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Segundo a classificação de Antônio Carlos Gil (2008), o trabalho realizado foi de natureza aplicada, de abordagem qualitativa, objetivos descritivos e o desenvolvimento por método de pesquisa bibliográfica.

A metodologia empregada no trabalho engloba uma extensa pesquisa bibliográfica em bases de dados como Science Direct, Web of Science, Google Acadêmico, entre outras. Foram selecionados artigos e trabalhos acadêmicos sobre a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados, em especial ômega 3 e ômega 6 a partir de microalgas, visando analisar os fatores que influenciam na obtenção desses ácidos graxos, tais como condições de cultivo, métodos de extração dos lipídeos e fatores operacionais da reação de hidrólise. A partir dos trabalhos previamente selecionados e com os dados obtidos foram construídos tabelas e gráficos ilustrativos para melhor visualização e análise comparativa dos resultados abordados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização do estudo proposto por esse trabalho, foram selecionados 6 trabalhos para a análise comparativa, os quais podem ser visualizados no Quadro 4. Vale ressaltar que os lipídeos foram extraídos de formas distintas, a fim de se obter as melhores condições e melhores métodos de extração para cada microrganismo estudado. Após a extração os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa. Nos experimentos foram utilizados diferentes tipos de fotobiorreatores, abertos e fechados, cada um possui um grau de complexidade diferente. Para os fotobiorreatores fechados pode-se controlar melhor a temperatura, pressão e condições de cultivo, por meio de trocadores de calor, agitadores e local de cultivo, sendo um sistema melhor reprodução dentro das condições especificadas em cada experimento. Por outro lado, o fotobiorreator aberto é financeiramente mais viável, mais fácil utilização, porém de difícil controle de temperatura e pressão, além de ser limitado quanto ao controle do crescimento de microalgas indesejadas.

Quadro 4 – Trabalhos com diferentes tipos de microalgas

Autor	Espécie	Fotobiorreator
Moraes, 2018	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Galões (plástico) 4L
	<i>Chlorella minutissima</i>	Tubulares tipo coluna de bolhas (acrílico) 50L
Zorn, 2017	<i>Dunaliella salina</i>	Tubulares tipo coluna de bolhas (acrílico) 50L
	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Tubulares tipo coluna de bolhas (acrílico) 50L
Garcia et al, 2015	<i>Scenedesmus accuminatus</i>	Tanque do tipo <i>raceway</i> 10000 L
	<i>Scenedesmus accuminatus</i>	Tanque do tipo <i>raceway</i> 10000 L
BERMUDEZ-SIERRA, 2018	<i>Scenedesmus sp</i>	Erlenmeyers 300 mL
	<i>Scenedesmus sp</i>	Erlenmeyers 300 mL
Matos et al, 2018	<i>Chlorella vulgaris</i>	Tanque do tipo <i>raceway</i> 4000 L
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Tanque do tipo <i>raceway</i> 4000 L
Amaral et al, 2015	<i>Chlorella sp.</i>	Seis vasos de 1,4L cada (8,4L)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Seis vasos de 1,4L cada (8,4L)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Seis vasos de 1,4L cada (8,4L)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Seis vasos de 1,4L cada (8,4L)

FONTE: (PRÓPRIO AUTOR)

Moraes (2018) estudou a produção de biomassa microalgal e extração de óleo a partir da microalga *Chlorella Vulgaris*. Os fotobiorreatores utilizados foram galões de plástico de 4L cada e os lipídeos foram determinados segundo a metodologia de Bligh & Dyer. Nessas condições, a fração de ácido linoleico (C18:2 – ômega 6) encontrado foi de 18,57% e a fração de ácido linolênico (C18:3 – ômega 3) foi de 16,41%. Ao todo, os ácidos graxos poli-insaturados nesse estudo representam 49,86% do total da biomassa encontrada, os ômega 3 e 6 representam 70,1% dos PUFA's, ou seja, a maior parte dos ácidos graxos encontrados nesses óleos foram de ômega 3 e 6.

Zorn (2017) estudou a composição de ácidos graxos da biomassa de três diferentes tipos de microalgas, *Chlorella minutíssima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*. Os três fotobiorreatores utilizados foram do tipo coluna de bolhas de 50L cada e os lipídeos foram determinados segundo o método Bligh & Dyer. A tabela 1 mostra as porcentagens de ômega 3 e 6 obtidos para cada tipo de microalgas.

Pode-se observar que nos três tipos de microalgas os ômega 3 e 6, com relação ao total de ácido graxo poli-insaturado s, representam aproximadamente a totalidade deles, ou seja, quase todos ácido graxo poli-insaturado s são ômega 3 e 6. A fração de ácido linolênico se mostrou superior em relação à fração de ácido linoleico apenas para a microalga *Chlorella minutíssima*. Para *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana* a fração de ácido linoleico revelou-se maior do que a fração de ácido linolênico.

Tabela 1: Porcentagem de ômega 3 e 6 para cada tipo de microalga estudada por Zorn (2017).

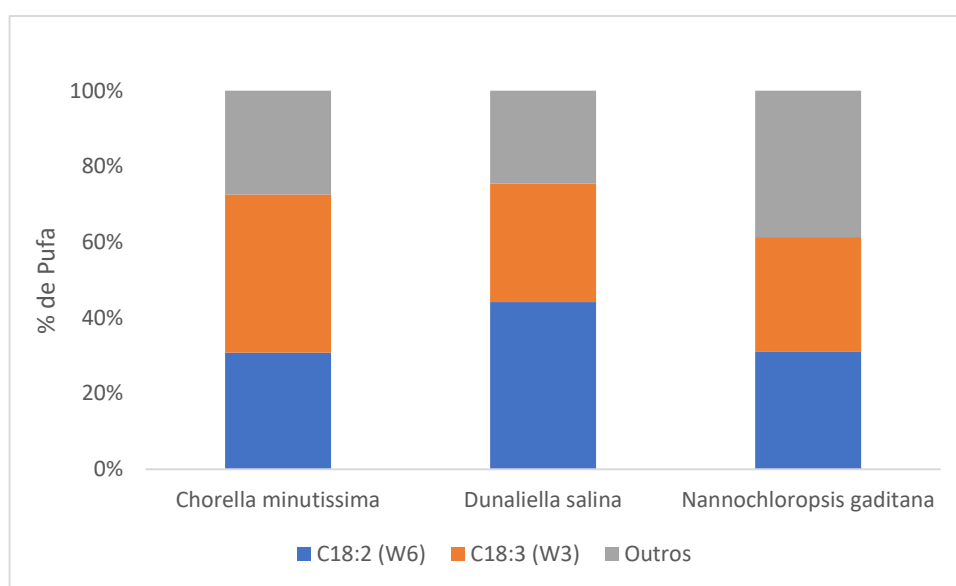
	C18:2 (W6)	C18:3 (W3)	Ácidos graxos poli-insaturado s
<i>Chlorella minutissima</i>	22,2 %	22,6 %	46,0 %
<i>Dunaliella salina</i>	30,0 %	16,0 %	47,7 %
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	19,7 %	12,6 %	33,0 %

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Analisando a Figura 13, verifica-se que a maior diferença entre os dois tipos de ácidos graxos encontradas pela microalga *Dunaliella salina*, em valores

percentuais, a quantidade de ômega 6 é aproximadamente o dobro da quantidade de ômega 3, 30% e 16% respectivamente. Ou seja, para uma produção de ômega 6, de acordo com esse estudo, a produção com *Dunaliella salina* mostra -se mais vantajosa. Por outro lado, se fosse visado a produção de ômega 3, a *Chorella minutissima* seria a mais indicada.

Figura 13: Distribuição dos principais ácidos graxos produzidos pelas microalgas *Chorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana* de acordo com o trabalho de Zorn (2017).

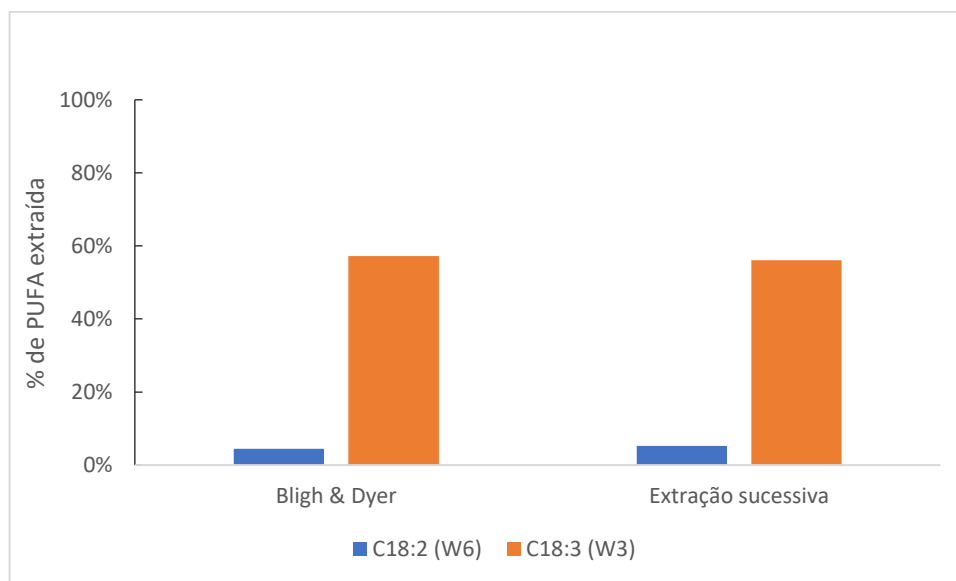


FONTE: PRÓPRIO AUTOR

No trabalho realizado por Garcia et al (2015), os autores realizaram os experimentos com a microalga *Scenedesmus accuminatus* e os dois fotobiorreatores utilizados para o cultivo da linhagem foram do tipo raceway com um volume de 10000 litros cada. Nesse trabalho foram avaliados 2 métodos de extração de lipídeos diferentes, Bligh & Dyer (método 1) e extração sucessiva (método 2). O método de extração sucessiva foi proposto por Baumgärtner et al. (2013). Para a realização deste método foram utilizados 1 g de biomassa e 10 mL de hexano, em um tubo falcon. O tubo foi aquecido em banho, sob agitação constante. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi recolhido. Ao tubo contendo o resíduo da biomassa foram adicionados mais hexano, sendo o tubo levado novamente ao banho e novamente centrifugado. Todo o processo foi repetido por seis vezes. Ao término da extração o solvente foi recuperado e o balão,

contendo os lipídeos, foi levado à estufa até obtenção de massa constante. A Figura 14 ilustra os resultados obtidos, em que pode ser observado uma similaridade do percentual de ômega 3 e 6 extraídos da microalga em função do método de extração empregado.

Figura 14: Comparação entre diferentes métodos de extração de lipídeos a partir da microalga *Scenedesmus accuminatus*.



FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Comparando os diferentes métodos, pode-se observar que pelo método 1, foram extraídos 57,2% de ômega 3, do total de produtos obtidos (ácidos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e outros), e 4,5% de ômega 6. Além disso, a quantidade de ácido linolênico mais de doze vezes superior em relação a quantidade de ácido linoleico. Do mesmo modo, pode-se observar um comportamento semelhante no método 2, sendo as porcentagens de ômega 3 e 6, 56% e 5,2% respectivamente. Ou seja, para ambos os métodos foi analisado uma composição de produtos oriundos da extração semelhantes.

BERMUDEZ-SIERRA (2018) comparou dois métodos diferentes de extração de lipídeos a partir da microalga *Scenedesmus sp.* O método 1 foi utilizando a metodologia Bligh & Dyer modificada com solventes orgânicos apolares (Acetato etila/metanol, Éter petróleo/metanol, Éter etílico metanol) e o método 2 foi utilizando o Bligh & Dyer modificado com solventes próticos polares (Clorofórmio/Etanol,

Clorofórmio/Iso-propanol, Clorofórmio/Terc-butanol). Para os dois métodos foi comparado com o método Bligh & Dyer padrão (Clorofórmio/Metanol 1:2).

Na tabela 2, pode-se observar os resultados obtidos pelo método 1.

Tabela 2: B&D modificado com solventes orgânicos apolares (quantidade de ácido graxo $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ óleo) BERMUDEZ-SIERRA (2018).

Ácidos graxos	B&D Clorofórmio / metanol (1:2)	Acetato etila / metanol	Éter petróleo / metanol	Éter etílico / metanol
C18:2 (ω 6) mg g^{-1}	0,3	0,08	1,98	1,17
C18:3 (ω 3) mg g^{-1}	1,56	-	1,76	0,65
Total PUFA mg g^{-1}	7,14	3,31	11,95	6,36
Total ac. Insaturados	59,90%	50,80%	59,40%	64,30%

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

No método 1 - B&D modificado com solventes orgânicos apolares, pode-se notar que a extração que obteve uma maior quantidade de ácidos insaturados foi com Éter etílico/metanol (64,30%). E a que obteve a menor extração de ácidos insaturados foi com Acetato etila/metanol (50,80%). Por outro lado, a extração com Éter petróleo/metanol revelou um resultado similar ao do método padrão, 59,40% e 59,90% respectivamente.

Analisando o total de PUFA pode-se notar que houve diferente para cada método de extração analisado. O método padrão de B&D obtém $7,14 \text{ mg g}^{-1}$ de óleo, porém com Éter petróleo/metanol obteve-se $11,95 \text{ mg g}^{-1}$ de óleo uma quantidade bem acima da quantidade padrão do método. Por outro lado, com o Acetato etila/metanol a quantidade foi bem abaixo do padrão, $3,31 \text{ mg g}^{-1}$ de óleo.

Tendo em vista que o atual trabalho tem interesse na produção de ômega 3 e 6, a extração com o Acetato etila/metanol não se mostrou relevante, devido ao teor de ácidos graxos poli-insaturados obtidos, 0,08 mg de ômega 6 e nenhuma quantidade significativa de ômega 3. A maior quantidade de ômega 3 foi observado na extração com éter petróleo/metanol 1,76 mg, quantidade similar do método tradicional, 1,56 mg. Do mesmo modo, para a obtenção de ômega 6 o método com éter petróleo/metanol quantidade, 1,98 mg, quantidade bem acima do método

padrão, 0,3 mg. A extração com éter etílico/metanol também revelou uma boa quantidade de ômega 6, 1,17 mg.

Na tabela 3 pode-se observar os resultados obtidos pelo método 2 (B&D modificado com solventes próticos polares).

Tabela 3: B&D modificado com solventes próticos polares (quantidade de ácido graxo mg g⁻¹ óleo) BERMUDEZ-SIERRA (2018).

Ácidos graxos	B&D-Clorofórmio / metanol (1:2)	Clorofórmio / Etanol	Clorofórmio / Iso-propanol	Clorofórmio / Terc-butanol
C18:2 (ω6)	0,3	1,87	-	-
C18:3 (ω3)	1,56	0,61	-	-
Total PUFA	7,14	7,05	0,85	2,21
Total ac. Insaturados	59,90%	63,12%	42,30%	75,60%

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Pode-se observar que no método 2, diferente do método 1, duas formas de extração não se mostraram muito eficientes para a produção de ômega 3 e 6, a extração com Clorofórmio/iso-propanol e Clorofórmio/terc-butanol, com quantidades insignificantes desses dois ácidos.

O método de extração com Clorofórmio/terc-butanol obteve uma maior porcentagem de ácidos insaturados, mas como pode ser observado, isso não reflete uma maior quantidade de ácidos poli-insaturados.

Por outro lado, a extração realizada com Clorofórmio/etanol resultou em valores similares a extração com Clorofórmio/metanol para o teor de ácidos insaturados, 63,12% e 59,9% respectivamente. A extração com Clorofórmio/etanol também se mostrou muito eficiente para a extração de ômega 6, 1,87 mg g⁻¹ de óleo, mais de um quarto do total de PUFA obtido. Porém, essa mesma extração não foi tão eficiente para a extração de ômega 3, 0,3 mg g⁻¹ de óleo.

Por outro lado, a extração padrão (B&D-Clorofórmio / metanol (1:2)) mostra-se mais eficiente para a obtenção de ômega 3, da ordem de 1,56 mg g⁻¹ de óleo e menos para ômega 6 0,3 mg g⁻¹ de óleo.

Comparando o método 1 e o método 2 pode-se concluir que para uma maior eficiência de extração de PUFA, a extração éter petróleo/ metanol, do método 1, obteve a maior quantidade em massa de ácidos poli-insaturados. Tanto para

ômega 3 quanto para ômega 6 essa extração foi a que obteve melhores resultados, de acordo com o estudo de c.

Matos et al (2018) comparou em seu estudo a produção de ácido linoleico e ácido linolênicos extraídas da microalga *Chlorella vulgaris* por meio de dois métodos diferentes de cultivo. Para o estudo foi utilizado um fotobiorreator do tipo *raceway* de 4000 L. Foi testado dois meios de cultivo, método 1 - controle Bold Basal Medium (BBM) e método 2 - controle Bold Basal Medium (BBM) com 25% de água salobra dessalinizada da região semiárida brasileira. A tabela 4 mostra os resultados obtidos.

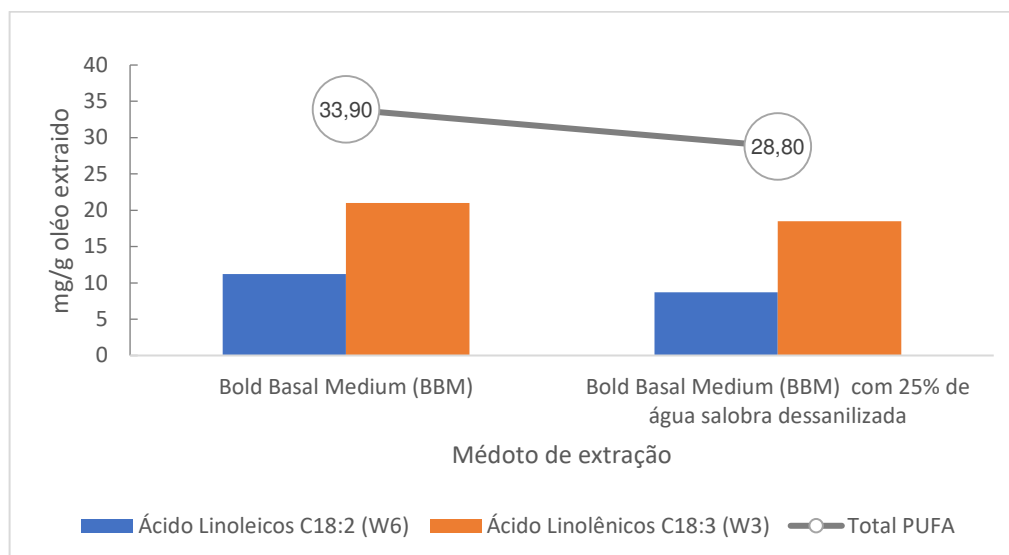
Tabela 4: Análise de extração de ácidos poli-insaturados (quantidade em mg·g⁻¹ óleo) Matos et al (2018).

	Bold Basal Medium (BBM)	Bold Basal Medium (BBM) com 25% de água salobra dessalinizada
Ácido Linoleicos C18:2 (W6)	11,20	8,70
Ácido Linolênicos C18:3 (W3)	21,00	18,50
Total PUFA	33,90	28,80
Total ac. Insaturados	70,27	70,81

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Pode-se observar pela tabela 4 que o cultivo Bold Basal Medium (BBM) com 25% de água salobra dessalinizada da região semiárida brasileira obteve uma maior quantidade de ácidos insaturados, entretanto, isso não representa mais ácidos poli-insaturados. A maior quantidade de PUFA foi obtida no cultivo Bold Basal Medium (BBM) 33,9 mg enquanto no método que utiliza água dessalinizada foi obtido 28,80 mg.

Na Figura 15 pode-se observar que a quantidade de PUFA obtida pelos dois métodos foi similar. Analisando a quantidade de ácido linoleico e ácido linolênico nota-se que para ambos o meio de Bold Basal Medium obteve melhores resultados, 11,20 mg e 21,00 mg respectivamente. Entretanto, para o método Bold Basal Medium (BBM) com 25% de água salobra dessalinizada os resultados foram menores, 8,70 mg para o ácido linoleico e 18,50 mg para o ácido linolênico.

Figura 15: Comparação entre BBM

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

No estudo realizado por Amaral et al (2015) foi comparado a quantidade de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados de três tipos de microalgas diferentes, *Chlorella sp*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa* e a metodologia adotada foi a Bligh e Dyer. A tabela 5 mostra a quantidade de PUFA e a quantidade total de ácido obtida após a extração das microalgas.

Tabela 5: Quantidade de PUFA (mg g⁻¹ de óleo) obtidas de acordo com o trabalho realizado por Amaral et al. (2015).

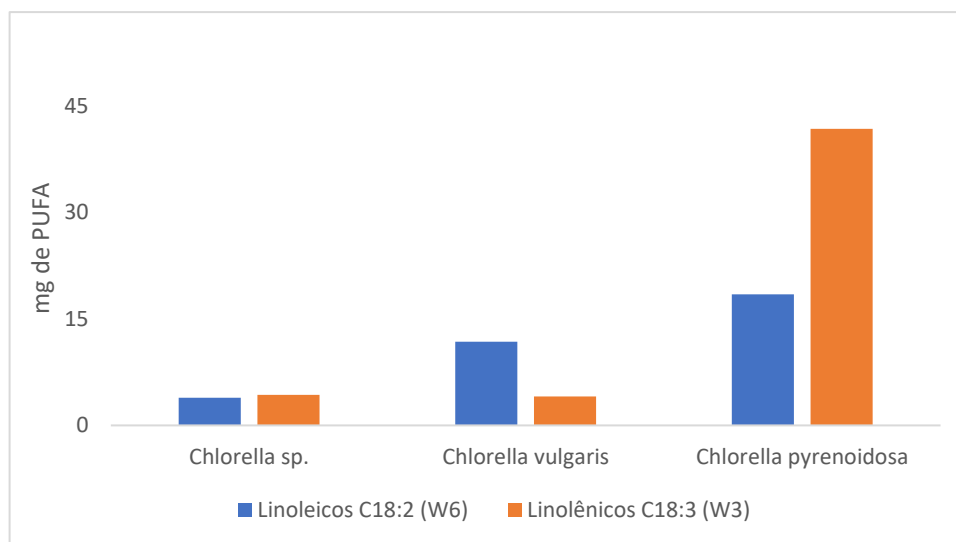
Espécie	Total de PUFA	% PUFA	Total de ácidos
<i>Chlorella sp.</i>	8,3	5,94%	139,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	20,1	20,10%	100
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	76,6	76,68%	99,9

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Pode-se notar que a espécie de microalga pertencente ao gênero *Chlorella* que forneceu a maior quantidade de ácido graxo poli-insaturado foi a *Chlorella pyrenoidosa*, 76,7% aproximadamente. As espécies *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris* revelaram uma quantidade menor, 20,10% e 5,94% respectivamente, comparadas com a *Chlorella pyrenoidosa*.

Na Figura 16, observa-se a quantidade de ômega 3 e 6 para cada espécie de microalga estudada.

Figura 16: Quantidade de ômega 3 e 6 obtidas por cada espécie de microalga estudada no trabalho de Amaral et al. (2015).



FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Pela análise da Figura 16 nota-se que produziu maiores quantidades de ômega 6 e ômega 3 é a *Chlorella pyrenoidosa*, 18,5 mg e 41,8 mg respectivamente. Nas variedades *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris* a quantidade de ômega 6 é maior do que a quantidade de ômega 3, situação que não se observa na variedade *Chlorella pyrenoidosa*, sendo a única que a quantidade de ômega 3 é maior que a quantidade de ômega 6.

A espécie *Chlorella sp* foi a espécie que obteve os menores valores dos dois ácidos graxos, 3,9 mg para ácido linoleico e 4,3 mg para ácido linolênico. A espécie *Chlorella vulgaris* apresentou uma quantidade intermediária de ômega 6, 11,8 mg, entre as três espécies e a menor quantidade analisando o ômega 3, 4,1 mg por grama de óleo extraído.

Dos trabalhos analisados pode-se realizar uma comparação entre três deles quanto a produção de ácidos graxos poli-insaturados com a variedade de microalga da espécie *Chlorella vulgaris* (MORAES, 2018; MATOS et al., 2018; AMARAL et al., 2015). Os tipos de fotobiorreatores utilizados foram o de sistema fechado por Moraes (2018), com um volume de 4L, e Amaral et al (2015), com 1,4L,

e sistema aberto para Matos et al (2018) com um volume maior comparado com os demais, 4000L. A tabela 6 mostra os resultados obtidos pelos três estudos.

Tabela 6: Comparação dos resultados obtidos de ômega 3 e 6

	Fotobiorreator	Cultivo	C18:2 (ω 6) (mg)	C18:3 (ω 3) (mg)	Total de PUFA (mg)	% PUFA	Total de ac. Obtidos (mg)
Moraes, 2018	Sistema fechado de 4L	Cultivo com aeração constante	18,57	16,41	49,86	50%	100
	Raceway 4000 L	BBM	11,2	21	33,9	48%	70,27
Matos et al, 2018	Raceway 4000 L	BBM com 25% de água salobra	8,7	18,5	28,8	41%	70,81
Amaral et al, 2015	Sistema fechado de 1,4L	Cultivo com aeração constante	11,8	4,1	20,1	20%	100

FONTE: PRÓPRIO AUTOR

De acordo com a tabela 6, o trabalho que obteve uma maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados foi Moraes (2018), sendo que aproximadamente 50% do total de ácidos obtidos foram PUFAs, ácidos linoleico e linolênico. Por outro lado, o experimento de Amaral et al (2015) obteve a menor quantidade de PUFAs entre os trabalhos analisados, da ordem de 20%. Matos et al (2018) alcançaram resultados de 41% e 48% para ômega 3 e ômega 6, respectivamente.

No estudo de Moraes (2018) observou-se uma maior quantidade de ômega 6, 18,57 mg por grama de óleo extraído, sendo a maior entres os demais trabalhos analisados. Nesse experimento, a microalga foi cultivada em sistema fechado de volume 4 L, esse volume representa 0,1% do volume utilizado nos experimentos de Matos et al (2018), entretanto a massa de ômega 6 obtida foi aproximadamente o dobro do cultivo conduzido no fotobiorreator tipo *raceway*. Nota-se que a menor quantidade de ômega 6 (8,7 mg) obtida no trabalho de Matos et al (2018) foi quando se utilizou o meio BBM com 25% de água salobra.

De acordo com os resultados analisados os teores obtidos para o ômega 3 foram diferentes em comparação ao ômega 6. O estudo que obteve uma maior

quantidade de ômega 3 (21 mg) foi Matos et al (2018) no experimento com BBM. Pode-se notar que para o ômega 3 esse experimento teve um resultado bastante satisfatório comparado com os demais. No estudo de Amaral et al (2015) a quantidade de ômega 3 foi a mais baixa de todos os demais, 4,1 mg. Além disso, nesse estudo não apenas a quantidade de ômega 3 foi a menor como também, a quantidade de PUFA's extraído da microalga.

Pela análise da tabela 6, dois experimentos obtiveram quantidades similares de ômega 6, Matos et al (2018) no experimento com BBM (11,2 mg) e Amaral et al (2015), 11,8 mg. No entanto, analisando o teor de ômega 3 obtido pelos trabalhos, nota-se que os resultados foram totalmente diferentes, 21 mg para Matos et al (2018), a maior quantidade entres todos os estudos analisados, e 4,1 mg em Amaral et al (2015), a menor quantidade de todos. Desta forma, verifica-se que dependendo das condições de cultivo empregadas pode favorecer a produção de um tipo específico de ácido graxo acumulado pela linhagem.

Tendo em vista que os estudos analisados na tabela 6 utilizaram volumes de reatores diferentes, de 1,4 L à 4000 L, percebe-se que não existe uma relação diretamente proporcional, ou seja, um fotobiorreator maior não, necessariamente, produz uma maior quantidade de ômega 6. Por outro lado, analisando ômega 3, pode-se inferir uma relação entre volume, um fotobiorreator maior produziu nesse caso uma quantidade maior de ômega 3. No estudo de Amaral et al (2015) foi utilizado o menor fotobiorreator entre os analisados, e obteve-se a menor quantidade de ômega 3, já em Matos et al (2018) no experimento com BBM obteve a maior quantidade de ômega 3.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos dados obtidos neste trabalho pode-se observar que o teor de ácido linoleico (ω -6) variou entre 0% e 30%:

- A microalga que obteve a maior produção de ômega 6, 30% de todos os ácidos graxos obtidos pela extração Bligh& Dyer, foi a *Dunaliella salina* cultivada em um fotobiorreator do tipo fechado e coluna de bolha com volume de 50 L.
- A menor produção de ω -6, 0%, foi obtida pela microalga *Scenedesmus sp.*

Para o ácido linolênico (ω -3) o teor variou de 0% a 57,23%:

- A microalga que obteve a maior produção de ômega 3, 57,23% foi a *Scenedesmus accuminatus* cultivada em um fotobiorreator aberto do tipo raceway de 10000 L, empregando o método de extração Bligh& Dyer).
- A menor produção de ω -3, 0% foi obtida para a microalga *Scenedesmus sp.*

Os valores de produtividade de ácidos graxos relatados neste trabalho mostraram que é importante, não apenas a escolha da microalga a ser utilizada para a produção de ômega 3 e ômega 6, mas também as condições utilizadas para o cultivo, o tipo do fotobiorreator, o método de extração empregado e outros parâmetros que podem influenciar na obtenção desses ácidos graxos poli-insaturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADARME-VEGA, T. C. et al. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–10, 2012.
- AGGELIS, G. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1476–1493, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>>.
- AMANDA, C. D. O. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. EM EFLUENTE DE BOVINOCULTURA BIODIGERIDO**. 2013. UNIVERSIDADE DO PARANÁ, 2013.
- BA, I. et al. Biodiesel from microalgae: Progress and challenges. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.
- BARCELLOS, A. D. et al. Microalgas E Seu Potencial De Uso. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 4, p. 178–184, 2012.
- BASRI, Z. AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE IN VITRO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*. p. 2016, 2016.
- BIANCA, G. S. **Estudo da influência da composição de ácidos graxos provenientes de cianobactérias do gênero *Synechococcus* nas propriedades finais do biodiesel**. 2016. Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, 2016.
- BIANCHINI, R. et al. Microalgae , products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- BORODYANSKI, G.; YANTOVSKI, E.; LEVIN, L. POWER PLANT WITH CO₂ - CAPTURE AND SOLAR ENERGY CONVERSION IN MICROALGAE MASS CULTURE. In: Israel. **Anais...** Israel: 1993.
- BUENO, T. **OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA**. 2005. FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA, 2005.
- CABALLERO, R. et al. Farmacología de los ácidos grasos omega-3. p. 3–19, 2006.
- CALDER, P. C. Biochimica et Biophysica Acta Marine omega-3 fatty acids and in flammatory processes : Effects , mechanisms and clinical relevance ☆. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>>.
- CONNOR, W. E.; CONNOR, S. L. The Importance of N-3 Fatty Acids in Health and Disease. **The Importance of N-3 Fatty Acids in Health and Disease**, v. 71, p. 1–6, 2000.
- DINIARA, S. **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS MARINHAS EM**

DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO. 2010. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2010.

EZE, V. C. et al. Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. **Algal Research**, v. 32, n. 1, p. 131–141, 2018.

FRANCISCO, F. D. F.; ANDRÉ, S. da C.; GILBERLANDIO, N. da S. **Hidrólise alcalina de óleos ou Gorduras. Fonte: Os autores | Download Scientific Diagram.** Disponível em: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Hidrolise-alcalina-de-oleos-ou-Gorduras-Fonte-Os-autores_fig1_319410404>. Acesso em: 19 mar. 2019.

GANESAN, B.; BROTHERSEN, C.; MCMAHON, D. J. Fortification of Foods with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 98–114, 2014.

Gil, A.C. Estudo da metodologia. 2008.

GOLDMAN, J. C.; CARPENTER, E. J. A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth1. **Limnology and Oceanography**, v. 19, n. 5, p. 756–766, 1 set. 1974. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.4319/lo.1974.19.5.0756>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

GONZÁLEZ, F. et al. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** [s.l.: s.n.]

GRESSLER, P. et al. MICROALGAS: APLICAÇÕES EM BIORREMEDIAÇÃO E ENERGIA. v. 24, n. 1, p. 48–67, 2008.

GRESSLER, P. D. **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL.** 2011. Universidade de Santa Cruz do Sul, 2011.

GUNSTONE, F. D. **Vegetables oil in food technology:Composition, Propierties and Uses.** [s.l.] Blackwell Publishing Ltd, 2002.

HATHERLY, M. M. F. **Pós-Graduação “Lato Sensu” Instituto a Vez Do Mestre.** 2011. UNIVERSIDADE CANDIDO MENDES, 2011. Disponível em: <http://www.avm.edu.br/docpdf/monografias_publicadas/k217136.pdf>.

HIJAZIN, C. A. H.; SIMÕES, A. T.; SILVEIRA, D. R. Hidrólise ácida , alcalina e enzimática. **Revista Atitude - Faculdade Dom Bosco de Porto Alegre**, n. 7, p. 89–93, 2010.

IYENGAR, G. **Ômega 3, Ômega 6 e Ômega 9.** Disponível em: <<https://www.infoescola.com/bioquimica/omega-3-omega-6-e-omega-9/>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

LAMARCA, C. P. et al. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1760–1767, 2009.

LAUBENSTEIN, T. D. et al. A negative correlation between behavioural and physiological performance under ocean acidification and warming. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4265, 12 dez. 2019. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/s41598-018-36747-9>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

LOURENCO, S. de O. **Cultivo de microalgas marinhas : princípios e aplicações**. [s.l.] RiMa, 2006.

LUIS, R.; PALOMINO, Q. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ELETRÔNICOS PARA OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DE PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DE MICROALGAS EM FOTOBIOREATORES. 2017.

MARIA, F. S. **Microalgas Alga2O Microalgae - The company**. Disponível em: <<http://www.alga2o.pt/index.php/en/>>. Acesso em: 4 mar. 2019.

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

MCCARTHY, P. M. et al. **Algae of Australia**. [s.l.] ABRS, 2006.

Método de Bligh & Dyer é um método de extração de lipídeos a frio, muito utilizado, criado por Bligh & Dyer em 1959

MUÑOZ, R. ALGAL-BACTERIAL PHOTOBIOREACTORS FOR THE DEGRADATION OF TOXIC ORGANIC POLLUTANTS. **Lund University Publications**, p. 183, 2005. Disponível em: <<https://lup.lub.lu.se/search/publication/545003>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

ONAY, M. et al. Evaluation of Various Extraction Techniques for Efficient Lipid Recovery from Thermo-Resistant Microalgae, *Hindakia*, *Scenedesmus* and *Micractinium* Species— **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, n. February, p. 141–150, 2016. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2016.72012>>.

PETER, C.; PATRICK, S. Aquaculture. **Volume120**, p. 135–150, 1994.

PIRES, J. C. M. et al. **Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept** **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, jun. 2012. . Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032112001499>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

RAY, F. E.; SUSAN, E. E. **Raven Biologia Vegetal**. 8ªEd ed. [s.l.: s.n.]

RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

RIZVI, S. S. H. **Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries**. [s.l.] Woodhead Pub, 2010.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2010.

RUXTON, C. H. S. et al. EBSCOhost: The health benefits of omega-3

polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **The British Dietetic Association Ltd**, v. 20, p. 275–285, 2007. Disponível em: <<http://ehis.ebscohost.com.ezproxy.endeavour.edu.au:2048/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=01cd1058-6536-4688-b4bd-e1b514473d14@sessionmgr198&vid=1&hid=102>>.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 132–138, 2006.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2010. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/22075>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

SÔNIA, G. B. C. L. **Biologia: volume único**. [s.l: s.n.]

SOUZA, J. C. P. V. B. **Microalgas decompõem dejetos suínos e geram biodiesel - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3231374/microalgas-decompoem-dejetos-suinos-e-geram-biodiesel>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

SUKLA, L. B. et al. **Environmental microbial biotechnology**. [s.l: s.n.]

TAMARA, M. et al. **Ômega 3: para que serve, benefícios e como tomar | Minha Vida**. Disponível em: <<https://www.minhavidade.com.br/alimentacao/tudo-sobre/17235-omega-3>>. Acesso em: 4 mar. 2019.

UBRABIO. **Publicação discute potencial das microalgas para produção de biodiesel no Paraná - Ubrabio**. Disponível em: <<https://ubrablo.com.br/2014/11/21/publicacao-discute-potencial-das-microalgas-para-producao-de-biodiesel-no-parana/>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

VARELA, J. et al. Alternative Sources of n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2259–2281, 2013.

VIÊGAS, C. V. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa* VISANDO À PRODUÇÃO DE ÉSTERES GRAXOS. 2010. Disponível em: <http://www.ppgquimica.furg.br/images/CAROLINA_VIEGAS.pdf>.

WIJENDRAN, V.; HAYES, K. C. DIETARY n-6 AND n-3 FATTY ACID BALANCE AND CARDIOVASCULAR HEALTH. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 597–615, 14 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132106>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

ZORN, S. M. F. E. Desenvolvimento do processo de extração de lipídeos da biomassa de microalgas marinhas. p. 126. 2017. Tese de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo - EEL USP. 2017.

