

## CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> E NO

Elisângela Martha Radmann e Jorge Alberto Vieira Costa\*

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil

Recebido em 5/5/07; aceito em 27/3/08; publicado na web em 4/9/2008

LIPID CONTENT AND FATTY ACIDS COMPOSITION VARIATION OF MICROALGAE EXPOSED TO CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> AND NO. The objective of the present work was to verify the lipid content and the fatty acid composition of the microalgae *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* and *Chlorella vulgaris* cultivated in a medium containing CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and NO. The microalga *Scenedesmus obliquus* presented the highest lipid content (6.18%). For the other microalgae the lipid content ranged from 4.56 to 5.97%. The major monounsaturated fatty acids content was 66.01% for *S. obliquus*. The PUFA were obtained in major amount by the microalgae *Spirulina* sp. (29.37%) and *S. nidulans* (29.54%). The palmitoleic acid was in larger amount, with 41.02% concentration (*Spirulina* sp.)

Keywords: fatty acids; carbon dioxide; microalgae.

### INTRODUÇÃO

Com o surgimento de indústrias e usinas termelétricas movidas a combustíveis fósseis, principalmente carvão e petróleo, as sociedades modernas passaram a liberar no ar grandes quantidades de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e outros gases, como dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO), agravando o efeito estufa. Existem diversos métodos para captura de CO<sub>2</sub> atmosférico, dentre os quais a biofixação por microalgas.<sup>1</sup> Com a utilização de CO<sub>2</sub>, as microalgas se multiplicam e produzem uma série de compostos de interesse, principalmente proteínas, ácidos graxos e corantes. Os ácidos graxos quando extraídos podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis.

Além das microalgas serem utilizadas para biofixar CO<sub>2</sub> da atmosfera, elas também vêm sendo estudadas como alimentos para humanos e animais, na agricultura, no tratamento de águas residuais e na obtenção de diversos compostos, com alto valor agregado, como corantes e ácidos graxos.<sup>2-5</sup> Os ácidos graxos nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os poliinsaturados (PUFA's) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais.<sup>6,7</sup> Comparadas aos vegetais superiores, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética e podem ser cultivadas em meio salino simples.<sup>8</sup> Em relação à produção de lipídios, as microalgas podem produzir, pelo menos, quinze vezes mais que a palma (*Elaeis guineensis*), um dos vegetais de maior rendimento e produtividade. A estimativa de produção de lipídios por microalgas varia de 15.000 a 30.000 L km<sup>-2</sup> e a extração é simples, podendo ser aplicados os métodos tradicionais usados na indústria química, incluindo a extração por solventes (em especial, hexano).

Diversos fatores influenciam a produção de lipídios e ácidos graxos por microalgas, como a intensidade luminosa,<sup>9-11</sup> a temperatura<sup>12</sup> e os nutrientes adicionados.<sup>13</sup> Dentre os nutrientes que podem influenciar a produção de lipídios e ácidos graxos, estão as fontes de nitrogênio e de enxofre, as quais são utilizadas pelas microalgas na síntese de aminoácidos e ácidos graxos.<sup>14</sup> Costa *et al.*<sup>15</sup> estudaram o efeito da concentração inicial de nitrato de sódio (0,003; 0,015; 0,030 e 0,060 M) no crescimento da microalga *Spirulina platensis*

e observaram que a concentração de ácidos graxos não foi influenciada pela concentração deste sal. Piorreck *et al.*<sup>16</sup> verificaram que microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio tiveram seu conteúdo lipídico incrementado sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos.

Segundo Ishida *et al.*<sup>17</sup> a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal e a adição de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo pode aumentar até 7 vezes a produtividade. Muradyan *et al.*<sup>18</sup> constataram que a concentração em ácidos graxos triplicou com aumento da concentração de 2 a 10% de CO<sub>2</sub> nos cultivos de *Dunaliella salina*.

O objetivo deste trabalho foi determinar o conteúdo lipídico e o perfil dos ácidos graxos das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 cultivadas na presença dos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO.

### PARTE EXPERIMENTAL

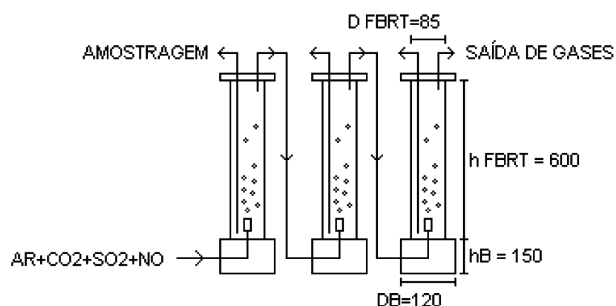
#### Microorganismos e meios de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Spirulina* sp. LEB-18,<sup>19</sup> *Scenedesmus obliquus* LEB-22,<sup>20</sup> *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, isoladas de lagoas próximas à Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM no extremo sul do Brasil, latitude 24°36'13''S e longitude 52°32'43''W. As microalgas foram mantidas e cultivadas em meio BG-11<sup>21</sup> (*C. vulgaris*) contendo (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub> 1,50; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0,04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,075; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,036; Citrato férrico 0,006; EDTA 0,001; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02; Ácido cítrico 0,006; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,86·10<sup>-3</sup>; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1,70·10<sup>-3</sup>; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,222·10<sup>-3</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,39·10<sup>-3</sup>; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,079·10<sup>-3</sup>; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,0404·10<sup>-3</sup>; meio Zarrouk modificado<sup>22</sup> (*Spirulina* sp. e *S. nidulans*) contendo (g L<sup>-1</sup>): CO<sub>2</sub> 12% (v/v); NaNO<sub>3</sub> 2,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0; NaCl 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2; CaCl<sub>2</sub> 0,04; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01; EDTA, 0,08 e micronutrientes; onde a fonte de carbono (bicarbonato de sódio) foi substituída por CO<sub>2</sub>; e em meio MC<sup>23</sup> (*S. obliquus*) contendo (g L<sup>-1</sup>): KNO<sub>3</sub> 0,25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,075; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,175; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,02 e micronutrientes. Os inóculos foram previamente adaptados a 1% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 7 dias.

\*e-mail: jorgealbertovc@terra.com.br

## Condições de cultivo

Foram realizados 4 ensaios em duplicata, onde foram comparadas as respostas conteúdo lipídico e composição em ácidos graxos, sendo expostas a 12% de CO<sub>2</sub>, 60 µL L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> e 100 µL L<sup>-1</sup> de NO à 30 °C. Os ensaios foram realizados em sistema de fotobiorreatores fechados em série do tipo tubulares (FBRT) de 2 L (volume útil de 1,8 L), conforme mostra a Figura 1, mantidos em câmara termostatazada a 30 °C com fotoperíodo 12 h claro/escuro durante 20 dias.<sup>24</sup> A concentração de biomassa inicial dos cultivos foi 0,15 g L<sup>-1</sup>.<sup>25</sup> A aeração foi realizada com ar comprimido misturado aos gases CO<sub>2</sub> (12%), SO<sub>2</sub> (60 µL L<sup>-1</sup>) e NO (100 µL L<sup>-1</sup>) dispostos em cilindros industriais. A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 0,54 L min<sup>-1</sup> durante o período claro, controlado através de válvulas solenóides. A iluminação de 3200 Lux foi fornecida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia.



$D_{\text{FBRT}}$ : diâmetro do fotobiorreator;  $h_{\text{FBRT}}$ : altura do fotobiorreator;  $D_B$ : diâmetro da base;  $h_B$ : altura da base.

**Figura 1.** Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série. Medidas em mm

## Quantificação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídios totais foi utilizada a metodologia proposta por Folch e Less.<sup>26</sup> A fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia proposta por Metcalfe e Schimitz.<sup>27</sup>

A determinação de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás modelo Varian – 3400CX equipado com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida contendo fase estacionária de polietileno glicol com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro. O gás de arraste foi nitrogênio a 0,5 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100 °C seguida de aumento de 8 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C, permanecendo por 20 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas.

Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Bellefonte, EUA) foram ácido caprótico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanóico (C11:0); ácido láurico (C12:0); ácido mirístico (C14:0); ácido miristoléico (C14:1); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoléico (C16:1); ácido margárico (C17:0); ácido margaroléico (C17:1); ácido esteárico (C18:0); ácido elaídico (C18:1 trans); ácido oléico (C18:1); ácido linoléico (C18:2); ácido  $\alpha$  - linolênico (C18:3 n-3); ácido  $\gamma$  - linolênico (C18:3 n-6); ácido araquídico (C20:0); ácido gadoléico (C20:1); ácido eicosadienóico (C20:2); ácido eicosatrienóico (C20:3); ácido araquidônico (C20:4); eicosapentaenóico (C20:5); ácido beênico (C22:0); ácido erúico (C22:1); ácido docosadienóico (C22:2); ácido docosahexaenóico (C22:6); ácido lignocérico (C24:0); ácido lignoceroléico (C24:1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as concentrações de ácidos graxos para os ensaios realizados com as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106. A microalga *Scenedesmus obliquus* LEB-22 apresentou o maior teor lipídico (6,18±0,20%, p≥0,46). Para *Spirulina* sp. LEB-18, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 foram obtidas as concentrações de 5,97±1,22% (p≥0,60), 5,00±0,80% (p≥0,60) e 5,21±0,06% (p≥0,60), respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Moraes e Costa,<sup>28</sup> com 5,20; 3,30 e 4,60% de lipídios para *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, respectivamente, com adição de 12% de CO<sub>2</sub>, porém sem adição dos gases SO<sub>2</sub> e NO. A variação das condições de cultivo pode fazer a produção de lipídios variar de 1 a 40% (p/p).<sup>6</sup> Segundo Illman *et al.*,<sup>5</sup> 30 °C e baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*. O aumento na fração lipídica também foi observado por Chu *et al.*<sup>29</sup> adicionando ao cultivo 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

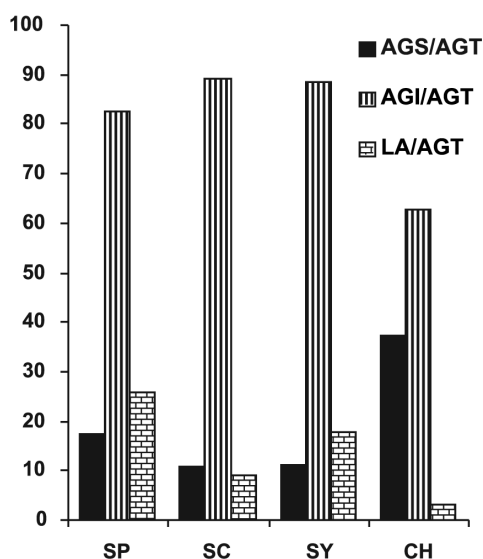
O maior conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS) foi obtido para *Chlorella vulgaris* LEB-106 (37,18%) e o maior conteúdo em ácidos graxos insaturados (AGI) foi 66,01% para a *Scenedesmus obli-*

**Tabela 1.** Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, cultivadas em 12% de CO<sub>2</sub>, 60 µL L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub>, 100 µL L<sup>-1</sup> de NO a 30 °C

	<i>Spirulina</i> sp.	<i>S. obliquus</i>	<i>S. nidulans</i>	<i>C. vulgaris</i>
Ácidos graxos saturados				
C 15:0	0,08	2,14	0,08	0,14
C 16:0	2,54	3,22	0,73	4,36
C 17:0	1,92	1,02	8,18	1,26
C 18:0	0,33	0,91	0,78	1,20
C 20:0	12,60	0,70	0,13	29,10
C 22:0	nd	nd	nd	0,15
C 23:0	nd	2,06	1,15	0,97
C 24:0	nd	0,58	0,09	nd
Ácidos graxos monoinsaturados				
C 14:1	0,26	0,57	0,36	0,21
C 15:1	1,26	1,57	0,09	2,30
C 16:1	41,02	37,01	36,04	23,47
C 17:1	2,45	6,28	2,73	1,80
C 18:1	8,04	18,27	16,9	21,81
C 20:1	0,14	0,67	nd	0,37
C 24:1	nd	1,64	2,85	1,00
Ácidos graxos polinsaturados				
C 18:2	2,71	3,98	3,53	6,26
$\alpha$ - C 18:3	7,61	3,52	0,10	nd
$\gamma$ - C 18:3	18,12	5,42	17,72	3,12
C 20:2	0,08	4,99	7,64	0,31
C 20:3	0,36	0,69	0,19	0,57
C 20:4	0,49	nd	0,12	0,49
C 20:5	nd	nd	0,10	0,13
C 22:2	nd	1,16	0,11	0,89
C 22:6	nd	3,60	0,13	0,10

nd = não detectado

quus LEB-22 (Figura 2). Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) foram produzidos em maior quantidade pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 (29,37%) e *Synechococcus nidulans* LEB-25 (29,54%). Resultados inferiores a estes, exceto para *Chlorella vulgaris* LEB-106, foram encontrados por Morais,<sup>28</sup> com 26,70; 50,50 e 72,00% de AGI e 5,40; 19,20 e 24,40% de PUFA, para as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, respectivamente, cultivadas com 12% de CO<sub>2</sub> em fotobiorreator do tipo erlenmeyer sem adição de SO<sub>2</sub> e NO. No presente trabalho, o fotobiorreator utilizado foi do tipo tubular em série que proporciona maior disponibilidade de luz e, conseqüentemente, maior utilização de CO<sub>2</sub>. Muradyan *et al.*<sup>18</sup> obtiveram 58,60% de AGS; 15,00% de AGM e 26,40% de PUFA para *D. salina* cultivada em meio enriquecido com 10% de CO<sub>2</sub>. Segundo Tsuzuki *et al.*,<sup>30</sup> a adição de CO<sub>2</sub> aos cultivos influencia no conteúdo lipídico e no grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo este, portanto, um nutriente essencial no cultivo de microalgas.



**Figura 2.** Percentuais de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos insaturados (AGI) e ácido linolênico (LA) pelo total de ácidos graxos analisados, e fração do ácido linolênico pelo somatório dos ácidos oléico e linolênico (O+L) para as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 (SP), *Scenedesmus obliquus* LEB-22 (SC), *Synechococcus nidulans* LEB-25 (SY) e *Chlorella vulgaris* LEB-106 (CH), cultivadas em meio contendo os gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO

Os PUFA podem atuar na prevenção e tratamento de muitas doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, redução dos níveis de colesterol e triacilglicerídeos no plasma, câncer, e, além disso, são considerados essenciais tanto para nutrição infantil quanto para o desenvolvimento cerebral.<sup>31-33</sup> A biomassa microalgal comparada com outras fontes de ácidos graxos, como diversas espécies de peixes (bacalhau, anchova e sardinha), apresenta algumas vantagens como ausência de contaminação com metais pesados e ainda certas microalgas possuem significativamente maior espectro de PUFA, alguns com cadeias com mais de 18 átomos de carbono.<sup>34</sup>

Dentre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (C16:0), que variou de 0,73 a 4,36% para as microalgas estudadas, é um ácido graxo importante para alimentação infantil, encontrado de 20 a 30% no leite materno.<sup>35</sup> O ácido araquídico (C20:0) foi mais abundante entre os AGS, apresentando 29,10% para microalga *Chlorella vulgaris* LEB-106. Já os demais AGS variaram entre 0,08 e 8,18%. Os ácidos graxos saturados (AGS) são importantes na produção de biodiesel, com alto número de cetano e são menos propensos à oxidação que os compostos insaturados.<sup>36</sup>

O ácido palmitoléico (C16:1) apresentou-se em maior concentração em relação aos outros ácidos graxos monoinsaturados (AGM), variando de 23,47 a 41,02%. O ácido palmitoléico é responsável pelo metabolismo dos lipídios, podendo ajudar no equilíbrio dos níveis de colesterol HDL e LDL, reduzir a taxa de açúcar no sangue e favorecer a queda de gordura dos tecidos que envolvem o fígado e o coração<sup>34</sup> e, além disso, é utilizado em cosméticos de ação rejuvenescedora. Os resultados apresentados são superiores aos encontrados por Maslova *et al.*,<sup>37</sup> que obtiveram 18,20% de ácido palmitoléico (C16:1) para a microalga *Synechococcus* sp. a 32 °C. Segundo Illman *et al.*,<sup>5</sup> a temperatura em torno de 30 °C é considerada ótima para aumentar a produção de lipídios. Os ácidos graxos monoinsaturados estão relacionados à diminuição dos níveis de colesterol, triacilglicerídeos, glicose e aumento do colesterol HDL. Por sua vez, o ácido oléico (C18:1) variou de 8,04 a 21,81% para as microalgas estudadas.

Dentre os PUFA, o ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3) apresentou predominância variando de 3,12 a 18,12%. A fração de ácido linolênico sobre os ácidos oléico e linolênico mostrou variação entre 0,11 a 2,40%, indicando que as condições de cultivo afetaram o grau de insaturação dos ácidos graxos presentes. Quanto maior a relação do GLA sobre os ácidos oléico e linolênico, maior a quantidade de GLA. Vários trabalhos têm sido realizados a fim de identificar as dessaturases responsáveis pela introdução da primeira e da segunda duplas ligações em ácidos graxos saturados.<sup>38</sup> Colla *et al.*<sup>2</sup> estudaram a influência da temperatura e da concentração de NaNO<sub>3</sub> no meio de cultivo sobre o perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina platensis*, e observaram que o fator mais importante foi a temperatura (30 e 35 °C), sendo que maiores concentrações do GLA foram obtidas a 30 °C, acompanhado por um decréscimo da concentração dos ácidos oléico e linolênico. Além da temperatura, os nutrientes do meio de cultivo também são muito importantes na produção de ácidos graxos, como a fonte de carbono.<sup>29</sup> Portanto, a concentração de 12% de CO<sub>2</sub>, 60  $\mu$ L L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> e 100  $\mu$ L L<sup>-1</sup> de NO favorece a produção de determinados ácidos graxos. Colla *et al.*<sup>2</sup> obtiveram 20,90% de ácido linolênico em ensaios a 30 °C e 2,5 g L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio. Segundo Ward e Singh,<sup>39</sup> o ácido linolênico pode ser utilizado no tratamento de diversas doenças, como esclerose múltipla e doenças cardiovasculares.

Foram encontrados traços de ácido eicosapentaenóico (C20:5) – EPA, produzido pelas microalgas *Synechococcus nidulans* LEB-25 (0,10%) e *Chlorella vulgaris* LEB-106 (0,13%). Este ácido pode atuar na prevenção de formação de blocos de prostaglandinas prejudiciais, como a prostaglandina D2 que induz a vasodilatação, hiperalgia e forte quimiotaxia de neutrófilos. A prostaglandina E2, liberada pelos queratinócitos, induz piroxia, hiperalgia, quimiotaxia de neutrófilos. O EPA também pode realçar e melhorar a função imunológica.

## CONCLUSÕES

A maior quantidade em ácidos graxos essenciais foi de 6,26% de ácido linolênico, ambos para *Chlorella vulgaris* LEB-106 e 25,73% de ácido linolênico para *Spirulina* sp. LEB-18. O perfil de ácidos graxos obtido para todas as microalgas, exceto *Chlorella vulgaris* LEB-106, mostrou ser o ácido palmitoléico (C16:1) o mais abundante, alcançando 41,02% (*Spirulina* sp. LEB-18). Para *Chlorella vulgaris* LEB-106 o ácido araquídico (C20:0) apresentou-se em maior concentração (29,10%).

O cultivo de microalgas com os gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO apresentou biomassa rica em ácidos graxos, podendo estes ser utilizados tanto para a alimentação, quanto para produção de biocombustíveis. Além disso, as microalgas estudadas podem contribuir na redução do aquecimento global, com a fixação do dióxido de carbono, principal componente dos gases do efeito estufa na atmosfera.

## AGRADECIMENTOS

À ELETROBRAS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e CGTEE – Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Brown, L. M.; Zeiler, K. G.; *Energy Convers. Manage.* **1993**, *34*, 1005.
2. Colla, L. M.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; *Z. Naturforsch. C.* **2004**, *59*, 55.
3. Richmond, A.; *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Black Well Science: Oxford, 2004, p. 566.
4. Molina-Grima, E.; *Biotechnol. Adv.* **2004**, *20*, 491.
5. Illman, A. M.; Scragg, A. H.; Shales, S. W.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 631.
6. Becker, W. Em ref. 3; Richmond, A., ed.; Blackwell Science: London, 2004, p. 312-351.
7. Brown, M. R.; *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1991**, *145*, 79.
8. Olguín, E.; Galicia, S.; Angulo-Guerrero, O.; Hernández, E.; *Bioresour. Technol.* **2001**, *77*, 19.
9. Pirt S. J.; *New Phytologist* **1986**, *102*, 3.
10. Tanticharoen, M.; Reungjitchawali, M.; Boonag, B.; Vondtaveesuk, P.; Vonshak, A.; Cohen, Z.; *J. Appl. Phycol.* **1994**, *6*, 295.
11. Hirano, M.; Mori, H.; Mura, Y.; Matsunaga, N.; Nakamura, N.; Matsunaga, T.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *24*, 183.
12. Thompson, P. A.; Guo, M.; *J. Phycol.* **1992**, *28*, 481.
13. Sukenik, A.; Wahnou, R.; *Aquaculture* **1991**, *97*, 61.
14. Richmond, A.; *Handbook of microalgal mass culture*, Boston: CRC Press, 1990.
15. Costa, J. A. V.; Linde, G. A.; Atala, D. I. P.; *World J. Microb. Biot.* **2000**, *16*, 15.
16. Piorreck, M.; Baasch, K. H.; Pohl, P.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 207.
17. Ishida, Y.; Hiragushi, N.; Kitaguchi, H.; Mitsutani, A.; Nagai, S.; Yoshimura, M.; *Fish. Sci.* **2000**, *66*, 655.
18. Muradyan, E. A.; Klyachko-Gurvich, G. L.; Tsoglin, L. N.; Sergeyenko, T. V.; Pronina, N. A.; *Russ. J. Plant Physiol.* **2004**, *51*, 53.
19. Costa, J. A. V.; Morais, M. G.; Dalcanton, F.; Reichert, C. C.; Durante, A. J.; *Z. Naturforsch. C* **2006**, *61*, 105.
20. Morais M. G.; Costa, J. A. V.; *J. Biotechnol.* **2007a**, *129*, 439.
21. Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J. W.; Herdman, M.; Stanier, R. G.; *J. Gen. Microbiol.* **1979**, *111*, 1.
22. Morais M. G.; Costa, J. A. V.; *Energy Convers. Manage.* **2007b**, *48*, 2169.
23. Watanabe, A.; *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1960**, *6*, 1.
24. Reichert, C. C.; Reinehr, C. O.; Costa, J. A. V.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2006**, *23*, 23.
25. Colla, L. M.; Reinehr, C. O.; Reichert, C.; Costa, J. A. V.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1489.
26. Folch, J.; Lees, M.; *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497.
27. Metcalfe, L. D. A. A.; Schimitz, J. R.; *Anal. Chem.* **1966**, *38*, 510.
28. Morais, M. G.; *Dissertação de Mestrado*, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2006.
29. Chu, W. L.; Phang, S. M.; Goh, S. H.; *J. Appl. Phycol.* **1996**, *8*, 389.
30. Tsuzuki, M.; Ohnuma, E.; Sato, N.; Takaku, T.; Kawaguchi, A.; *Plant. Physiol.* **1990**, *93*, 851.
31. Simopoulos, A. P.; *Biomed. Pharmacoth.* **2002**, *56*, 365.
32. Fábregas, J.; Herrero, C.; Gamallo, Y.; Otero, A.; Paz, J. M.; Vecino, E.; *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1994**, *40*, 540.
33. Borowitzka, M.; *Infofish Internat.* **1993**, *5*, 21.
34. Wen, Z. Y.; Chen, F.; *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *25*, 218.
35. Willis, W. M.; Lencki, R. E.; Marangoni, A. G.; *Crit. Rev. Food Sci.* **1998**, *38*, 639.
36. Canakci, M.; *Bioresour. Biotechnol.* **2007**, *98*, 183
37. Maslova, I. P.; Mouradyan, E. A.; Lapina, S. S.; Klyachko-Gurvich; Los, D. A.; *Russ. J. Plant Physiol.* **2004**, *51*, 353.
38. Deshniun, P.; Paithoonrangsarid, K.; Suphatrakul, A.; Meesapyodsuk, D.; Tanticharoen, M.; Cheevadhanarak, S.; *FEMS Microbiol Lett.* **2000**, *184*, 207.
39. Ward. O. P. ; Singh, A.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3627.