

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FREDERICO PACHECO MILITÃO

Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica

VITÓRIA - ES

2016

FREDERICO PACHECO MILITÃO

Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Valéria de Oliveira Fernandes

VITÓRIA - ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M644e Militão, Frederico Pacheco, 1992-
Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica / Frederico Pacheco Militão. – 2016.
69 f. : il.

Orientador: Valéria de Oliveira Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Biocombustíveis. 2. Microalga. 3. Temperatura. 4. Plantas – Cultivo. 5. Alimentos. I. Fernandes, Valéria de Oliveira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

FREDERICO PACHECO MILITÃO

“Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 25 de agosto de 2016.

Comissão Examinadora:



Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes
Orientadora e Presidente da Comissão - UFES



Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Membro Titular Interno - UFES



Dr. Levi Pompermayer Machado
Membro Titular Externo - UNESP

Aos meus familiares e amigos, todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Á Deus em primeiro lugar por toda a sabedoria a mim concedida e por sempre me guiar no melhor caminho;

Aos meus pais e irmãos, por serem a minha base e fonte de apoio e amor incondicional;

Á Professora Doutora Valéria de Oliveira Fernandes pela orientação, carinho, amizade e confiança durante todos esses anos;

Ao Professor Doutor Levi Pompermayer Machado por toda atenção, ajuda e ensinamento concedidos durante o desenvolvimento desta pesquisa;

Aos membros constituintes da banca examinadora, Professora Doutora Maria do Carmo Pimentel Batitucci e Professor Doutor Levi Pompermayer Machado, que aceitaram de bom grado contribuir para o melhoramento deste trabalho com suas críticas e sugestões;

Ao Professor Doutor Pio Colepicolo e a Doutora Aline Martins, da Universidade de São Paulo, pela ajuda na análise do perfil dos ácidos graxos;

Á Larissa Bassani, eterna primeira orientadora, e Adriano Goldner pelo carinho e pela leitura de partes da dissertação, por suas críticas e sugestões a fim de melhorar este trabalho;

Á Franciny, amiga para todas as horas que levo para a vida, obrigado por estar sempre disposta a ajudar. Faltam palavras para agradecer todo o apoio, conselhos e ajuda dados durante o desenvolvimento deste trabalho;

Á Kathiani, sua amizade e ajuda foram fundamentais para conclusão deste trabalho, obrigado por ser tão especial, as longas tardes e noites analisando amostras foram muito mais calmas e divertidas com você;

Aos amigos Brener e Fernanda que mesmo não sendo exatamente do cultivo me ajudaram no que puderam. Obrigado, aqui incluo também a Fran, pelos momentos de cumplicidade, pelo cafezinho de toda tarde e pela amizade dentro e fora do laboratório;

Á Pâmela e Sandra, amigas especiais que tornam a vida no laboratório mais alegre. Obrigado pela ajuda, carinho e amizade. Aos demais companheiros de LATEAC, obrigado pelos momentos de muita conversa, diversão, desespero e também de aprendizado juntos.

Aos alunos dos demais laboratórios da botânica, em especial Leonardo V. Zanetti, pelas dúvidas estatísticas e metodológicas sanadas, empréstimo de material e equipamentos;

A todos os professores e funcionários da botânica, atuais e antigos, em especial ao Ricardo, profissional e competente e a Beth que, com toda certeza, contribuiu para que os dias ali fossem muito mais alegres! Obrigado pelo carinho;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desta pesquisa, deixo aqui o meu muito obrigado.

RESUMO

A biomassa microalgal tem diversas aplicações comerciais, sobretudo nas indústrias farmacêutica, de alimentos, da criação animal e, mais recentemente, de biocombustíveis. O uso de populações de microalgas em culturas mistas pode conferir vantagens como a redução de custos com contaminação e obtenção de biomassa rica em lipídeos, carboidratos e proteínas. O presente estudo, portanto, visou avaliar o cultivo unialgal e misto de *Pseudopediastrum boryanum* e *Scenedesmus obliquus* em duas diferentes temperaturas, em escala laboratorial, em termos da biomassa e da composição bioquímica. O experimento, em triplicata, foi conduzido, em estufas ajustadas às temperaturas de 20 e 30°C, em meio ASM1, fotoperíodo 12/12h e aeração constante por 21 dias. O inóculo foi de $1,5 \times 10^5$ células/mL para as monoculturas e $7,5 \times 10^4$ células/mL, de cada espécie, no cultivo misto. Maior densidade celular ($13,6 \times 10^6$ cel/mL) e biomassa (55 g/L) foram registrados no cultivo unialgal de *S. obliquus* em 30°C. Maiores concentrações de proteínas (672,6 mg/g) foram registradas nos tratamentos P20 e S20 e de carboidratos (6,17 mg/g) em P30. Não houve diferença significativa no teor de lipídeos totais extraídos nos tratamentos S20 (95,5 mg/g), P20 (96,3 mg/g) e M20 (105,3 mg/g). A composição dos FAMES nas microalgas variou de forma significativa no que diz respeito ao número de insaturações, sendo em sua maioria composta de ácidos graxos monoinsaturados (14-41,8%) e tri-insaturados (18,8-33,2%). Com base nos resultados, conclui-se que o cultivo misto de *S. obliquus* e *P. boryanum* obteve baixos valores de crescimento e de produção de carboidratos. Alterações na temperatura influenciam o crescimento e a produção de grande parte dos biocompostos, entretanto essa influência difere entre os tratamentos. O perfil de FAMES não se adequa às normas vigentes para a produção de biocombustíveis, todavia a biomassa rica em proteínas e ácidos graxos essenciais (Ômega 3), sugere um potencial uso como suplemento na alimentação humana e de animais.

Palavras-chave: Cultivo misto, temperatura, alimentação, biocombustível

ABSTRACT

The microalgal biomass has several commercial applications, especially in the pharmaceutical, food, animal feed and, more recently, the biofuels industry. The use of microalgae populations in mixed cultures can provide advantages such as cost reduction with contamination and obtaining biomass rich in lipids, carbohydrates and proteins. This study aimed to evaluate the unialgal and mixed cultivation of *Pseudopediastrum boryanum* and *Scenedesmus obliquus* at two different temperatures, in laboratory scale, in terms of biomass and biochemical composition. The experiment was conducted in triplicate, in temperatures set of 20 and 30°C, medium ASM1, photoperiod 12/12h and continuous aeration for 21 days. The inoculum was $1,5 \times 10^5$ cell/mL to monocultures and $7,5 \times 10^4$ cell/mL, of each species, in mixed culture. Increased cell density (13.6×10^6 cell/mL) and biomass (55 g/L) were recorded in unialgal *S. obliquus* culture at 30°C. High protein concentrations (672.6 mg/g) were observed in P20 and S20 treatments and carbohydrates (6.17 mg/g) in P30. There was no significant difference in total lipid content extracted in S20 (95.5 mg/g), P20 (96.3 mg/g) and M20 (105.3 mg/g). FAMES composition of the microalgae, varied significantly as regards the number of saturations, being mostly composed of monounsaturated fatty acids (14 to 41.8%) and tri-unsaturated fatty acids (18.8 to 33.2%). Based on the results, it is concluded that the mixed cultivation of *S. obliquus* and *P. boryanum* not shown good results of growth and production of biochemicals. Changes in temperature affect the growth and yield of most biocompounds but, this influence differs between treatments. The FAMES profile doesn't fit the rules in force for production of biofuels, however, the biomass rich in protein and essential fatty acids (Omega 3), suggesting a potential use as a supplement in human food and animal feed production.

Keywords: Mixed cultivation, temperature, feeding, biofuels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa em fotobiorreatores	14
Figura 02 – Sistema de cultivo de microalgas em lagoas abertas do tipo circular (a) e pista de corrida (<i>raceways</i>) (b)	15
Figura 03 – <i>Pseudopediastrum boryanum</i> (Turpin) E. Hegewald var. <i>boryanum</i> , cultivada em meio ASM1	22
Figura 04 – <i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kutzing cultivada em meio ASM1 ..	23
Figura 05 – Disposição dos erlenmeyrs em uma das estufas utilizadas para o experimento.....	25

Capítulo 1: Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica

Figura 01 – Curva de crescimento dos cultivos unialgais e mistos de <i>P. boryanum</i> e <i>S. obliquus</i> nas temperaturas de 30°C (A) e 20°C (B). Médias de densidade celular.....	45
Figura 02 – Variações na densidade celular, em porcentagem, das populações de <i>P. boryanum</i> e <i>S. obliquus</i> nos cultivos mistos em de 30°C (A) e 20°C (B)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição das soluções estoque do meio ASM 1. Concentrações de diluição em 200 mL para a Solução A e 100 mL para as Soluções B, C e D..... 26

Capítulo 1: Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica

Tabela 01 – Parâmetros de crescimento (taxa de crescimento - K, tempo de duplicação - G e rendimento máximo - R_{máx}) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (log) dos tratamentos 44

Tabela 02 – Análises de biomassa (massa seca) durante o cultivo 46

Tabela 03 – Conteúdo de carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis e lipídeos totais de *P. boryanum*, *S. obliquus* cultivados individualmente e em cultivo misto nas temperaturas de 30 e 20°C 48

Tabela 04 – Conteúdo de clorofila 'a' e carotenoides totais de *P. boryanum* e *S. obliquus* cultivados individualmente e em cultivo misto, nas temperaturas de 30 e 20°C, em dois períodos do cultivo..... 50

Tabela 05 – Teores (%) de ácidos graxos saturados (SFA), di-insaturados (DUFA), tri-insaturados (TUFA) e poli-insaturados (PUFA)..... 51

Tabela 06 – Composição de ésteres metílicos de ácidos graxos (% do total de FAME) extraídos da biomassa de *P. boryanum* e *S. obliquus* em seus cultivos unialgais e mistos nas temperaturas de 30 e 20°C 52

Tabela 07–Razão ômega3/ômega6 dos tratamentos cultivados em 30 e 20°C... 53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 HIPOTESE DA PESQUISA.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	21
4.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS.....	21
4.2 ESPÉCIES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO	21
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ESTATÍSTICO	24
4.4 MEIO DE CULTURA	25
4.5 ESQUEMA DOS TRATAMENTOS.....	26
4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	27
4.7 ANÁLISES DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS E PIGMENTOS.....	27
4.8 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	29
4.9 INTERPRETAÇÕES DOS RESULTADOS.....	30
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	32
 Capítulo 1: Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica	
ABSTRACT	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS.....	41
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41

2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	41
2.4 CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, LIPÍDEOS TOTAIS E PIGMENTOS	42
2.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	43
2.6 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS	44
3 RESULTADOS.....	44
3.1 CRESCIMENTO E MASSA SECA	44
3.2 CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E LIPÍDEOS TOTAIS	47
3.3 CLOROFILA 'A' E CAROTENOIDES TOTAIS	49
3.4 PERFIL DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	50
4 DISCUSSÃO	53
4.1 CRESCIMENTO E MASSA SECA	53
4.2 CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E LIPÍDEOS TOTAIS	55
4.3 CLOROFILA 'a' E CAROTENOIDES TOTAIS.....	59
4.4 PERFIL DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	61
4.4.1 Potencial uso como matéria prima para biodiesel	61
4.4.2 Potencial uso na alimentação	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

As algas estão entre os organismos vivos mais primitivos da história da Terra, tendo a sua origem datada do período Pré-cambriano, há três bilhões e meio de anos (BOLD; WYNNE, 1985). Em 1753, Lineu propôs “alga” como uma categoria taxonômica, porém, hoje esse termo é usado para designar uma grande variedade de organismos fotoautotróficos, clorofilados, criptógamos e talófitos, e já não possui nenhum valor taxonômico, sendo rebaixado a um agrupamento taxonômico (BICUDO; MENEZES, 2006).

Algas fitoplanctônicas vivem em suspensão na coluna d’água e estão sujeitos aos movimentos de marés e correntes. Por serem autotróficos, são os principais responsáveis pela produção primária dos ambientes aquáticos marinhos, dulcícolas ou salobros (REYNOLDS, 2006), sendo, portanto, a base das cadeias alimentares nestes ecossistemas. São muito utilizadas como bioindicadoras da qualidade da água, devido à rápida resposta às variações ambientais e por possuírem um ciclo de vida curto (ESTEVES, 2011).

Dentre os grupos de algas fitoplanctônicas, destaque-se a Classe Chlorophyceae, pertencente à Divisão Chlorophyta, por ser muito frequente, caracteriza-se pela coloração verde ou esverdeada por possuírem as clorofilas “a” e “b” como pigmentos principais. Possui cerca de 8000 espécies descritas e acredita-se que este número seja muito maior atualmente, sendo que 90% são de ambientes lacustres, principalmente lagos e lagoas mesotróficos ou eutróficos (ESTEVES, 2011; FOTT, 1971; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Dentre os agrupamentos taxonômicos algais, a Divisão Chlorophyta é uma das mais visadas para a extração de óleo algáceo, devido ao seu rápido crescimento, fácil adaptação às variações ambientais e também por serem facilmente cultiváveis (TEIXEIRA; MORALES, 2006).

O cultivo de microalgas tem sido uma importante ferramenta para elucidar diversos aspectos da biologia das espécies, principalmente quanto à variabilidade morfológica, plasticidade fenotípica, características bioquímicas, metabolismo vegetativo/reprodutivo e ciclo de vida, contribuindo assim para aumentar o conhecimento sobre a ecologia e taxonomia desses organismos. A criação e a manutenção desses cepários auxiliam também na conservação das espécies de microalgas existentes. Além disso, o desenvolvimento das pesquisas com culturas

algas tem proporcionado o uso cada vez maior de microalgas em testes de toxicidade, melhorando assim a avaliação dos impactos ambientais causados por algumas substâncias que são lançadas em ambientes aquáticos (LOURENÇO, 2006).

O aumento gradativo no interesse por cultivo de microalgas se deve não só por sua importância ambiental e biológica, mas também pela produção de compostos de relevância comercial como proteínas, carboidratos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados, e pigmentos como carotenóides e clorofila (DERNER; OHSE; VILLELA, 2006).

Os cultivos de microalgas em grande escala são realizados, em sua maioria, para a obtenção de proteínas usadas como suplemento alimentar, tanto na alimentação de animais como na humana. Estas podem ser encontradas em formulações em pó, tabletes, cápsulas, extratos, misturados a alimentos industrializados como biscoitos, doces e bebidas (LOURENÇO, 2006). O uso da cianobactéria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) como fonte de alimento para humanos e animais ocorre há pelo menos 700 anos, pelo seu alto teor proteico (RICHMOND, 2004). São cinco os gêneros de microalgas mais usados na alimentação humana: *Aphanizomenon* e *Arthrospira* (cianobactérias), *Chlorella*, *Dunaliella* e *Scenedesmus* (Chlorophyceae) (RICHMOND, 2000 *apud* LOURENÇO, 2006).

Microalgas também são cultivadas para uso na indústria farmacêutica, de corantes e de cosméticos. O cultivo para extração de pigmentos como os carotenóides, principalmente astaxantina e betacaroteno, pode ser aproveitado como corantes de alimentos e rações e também como substância antioxidante e fonte de vitamina A (LOURENÇO, 2006). Outros pigmentos também são comercializados, como por exemplo as ficobilinas, produzidas por algumas algas, como as cianobactérias e criptófitas. Esses pigmentos apresentam coloração azulada, sendo chamados de ficocianinas, e avermelhadas, as ficoeritrinas. As ficobilinas são empregadas como corantes na indústria de alimentos, como matéria-prima para a produção de cosméticos e também em ensaios imunológicos, através da produção de corantes fluorescentes (BECKER, 2004; LOURENÇO, 2006). A cianobactéria *Arthrospira* e as algas vermelhas unicelulares *Porphyridium* e *Rhodella*, são algumas das principais fontes de ficobilinas (LOURENÇO, 2006). Além dos usos supracitados, espécies de microalgas podem produzir uma série de moléculas bioativas com efeito antibióticos,

anticancerígenos, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras de colesterol, enzimáticas e entre outras (DERNER; OHSE; VILLELA, 2006).

Atualmente, o cultivo de microalgas em escala comercial é realizado em lagoas abertas ou em fotobiorreatores fechados (CHISTI, 2007), sendo as lagoas abertas o sistema de produção mais comum em operação, devido, principalmente, ao baixo custo necessário para sua implantação, manutenção e aumento em escala (COPLIN, 2012; MILLEDGE, 2011).

Os fotobiorreatores são sistemas de cultivo fechado, formados por tubos ou placas de vidro, de plástico ou de policarbonato, organizados de forma a otimizar a absorção de luz pelas células (Figura 01). A aeração é mantida de forma constante para melhorar a distribuição dos nutrientes e as trocas gasosas, assim como a temperatura, pH e iluminação (COPLIN, 2012), o que confere maior produtividade em biomassa comparado as lagoas abertas; no entanto, o custo de produção em fotobiorreatores é elevado (CHISTI, 2007); sendo indicado apenas para o cultivo de cepas que demandem maior controle dos fatores ambientais (MILLEDGE, 2011).

Figura 01 – Cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa em fotobiorreatores.

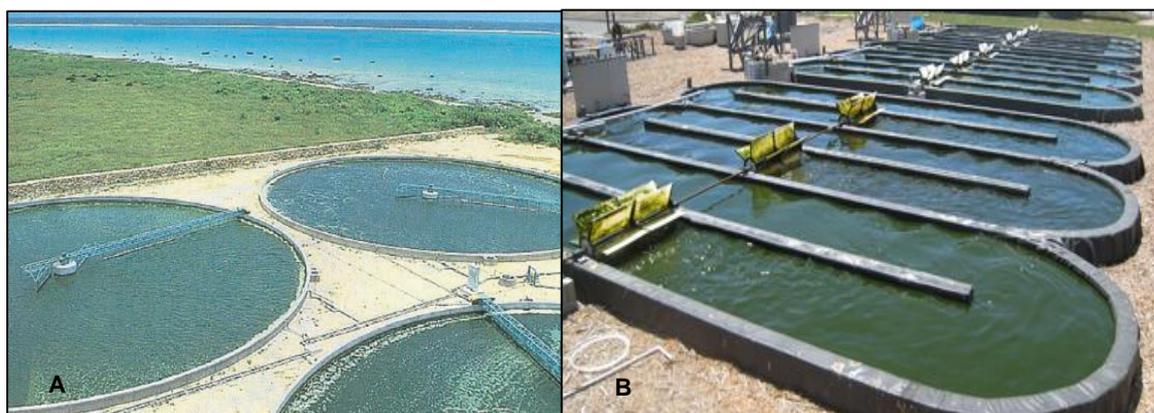


Fonte: Koller (2015).

Para a produção de biomassa em sistemas de lagoas abertas é preferível o uso de espécies resilientes e capazes de sobreviver sob condições adversas, pois, a fim de reduzir a população de organismos contaminantes, condições seletivas como altas

concentrações de salinidade, bicarbonatos e altos valores de pH, são comumente empregadas (COPLIN, 2012; MILLEDGE, 2011). São dois os principais tipos de lagoas abertas usadas, as lagoas circulares e as lagoas de corrida (Figura 02). As lagoas circulares possuem cerca de 30-70 centímetros de profundidade e são agitadas por um bastão giratório instalado no centro da lagoa. Por outro lado, as lagoas do tipo pista de corrida são formadas por canais de recirculação, com profundidades entre 20 e 30 centímetros e a recirculação e a agitação são realizadas por pás fixas instaladas de cada lado da lagoa (HANNON *et al.*, 2010; COPLIN, 2012).

Figura 02 – Sistema de cultivo de microalgas em lagoas abertas do tipo circular (a) e pista de corrida (*raceways*) (b).



Fonte: Clifford (2015).

Nos últimos anos as pesquisas com microalgas para fins comerciais se expandiram, e houve um aumento nas investigações que buscam a produção de biodiesel tendo como fonte estes microrganismos, uma vez identificado seu potencial como matéria prima (LOURENÇO, 2006).

Muitas vantagens são apontadas na utilização de microalgas como fonte de biocombustível e dentre elas destacam-se: 1) apresentam alta taxa de crescimento e reprodução, 2) o cultivo de microalgas não depende de terras aráveis, não competindo, dessa forma, com áreas destinadas a plantação de alimentos, 3) não necessitam da aplicação de herbicidas, 4) podem crescer em meios alternativos como águas residuais e efluentes, 5) algumas espécies produzem naturalmente uma grande quantidade de lipídeos, e esta pode ser facilmente aumentada modificando as condições de cultivo, 6) são organismos extremamente eficientes em fixar dióxido de

carbono e 7) produzem mais óleo por área se comparado as plantas terrestres (BECKER, 2013; DISMUKES *et al.*, 2008; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; OHSE *et al.*, 2007; PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009; HANNON *et al.*, 2010).

Sabe-se que as populações de microalgas podem ser afetadas por fatores bióticos (parasitismo, alelopatia, competição por recursos e herbivoria) e abióticos (temperatura, pH, incidência de luminosidade, velocidade de correnteza e concentrações de nutrientes) (ESTEVES, 2011; GUILLARD; MORTON, 2003).

Além disso, a composição bioquímica da microalga é definida não só pela natureza da espécie em questão, mas por uma interação desta com outros fatores (MIAO; WU, 2004), sendo a temperatura uma das variáveis que mais interferem na taxa metabólica, influenciando na composição e no conteúdo de lipídeos das microalgas (LOURENÇO, 2006; RENAUD *et al.*, 2002).

Estudos indicam que espécies de microalgas cultivadas em altas temperaturas apresentam decréscimo em seu conteúdo proteico e acréscimo no conteúdo de carboidratos e lipídeos (RAFIQUL *et al.*, 2003). A temperatura é, provavelmente, um dos fatores mais importantes com influência direta nos ácidos graxos produzidos pelas microalgas. De forma geral, espécies cultivadas em temperaturas baixas produzem maior quantidade de ácidos graxos insaturados, embora a resposta à temperatura de crescimento varie de espécie para espécie, com nenhuma relação consistente entre a temperatura e as insaturações presentes nos ácidos graxos (HARWOOD; GUSCHINA, 2013; THOMPSON *et al.*, 1992).

De modo geral, é tido que o crescimento das microalgas tende a aumentar exponencialmente com a elevação da temperatura até um ponto ótimo, a partir do qual a cultura entra em declínio (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009). A temperatura ideal para o cultivo de microalgas depende de certa forma, da finalidade do cultivo e das necessidades da espécie estudada. Em regiões tropicais, onde as temperaturas são elevadas o cultivo de microalgas pode ser realizado sob temperaturas acima de 20°C (LOURENÇO, 2006).

Sayegh e Montagnes (2011) os quais visaram observar os efeitos das variações da temperatura na composição bioquímica e em crescimento das microalgas, cultivaram quatro diferentes linhagens de *Isochrysis galbana* e uma cepa de *Nanochloropsis* sp. nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C. Estes autores observaram um incremento na

densidade celular nos cultivos e uma diminuição no biovolume celular de todas as cepas com o aumento da temperatura. Também foi observado que a temperatura alterou as concentrações e produção de proteínas, carboidratos e lipídeos de forma não intuitiva, constatando que, principalmente para esses fatores, o efeito da temperatura é variável de acordo com as linhagens, sublinhagens ou cepas cultivadas.

Já Chokshi *et al.* (2015) evidenciaram a importância do conhecimento da temperatura ótima da cepa cultivada e o efeito da variação da temperatura ambiental nos cultivos realizados em ambientes abertos, sujeitos a tais variações, no que diz respeito ao crescimento e composição bioquímica. Esses autores cultivaram a microalga *Acutodesmus dimorphus* em condições de temperatura constante (25, 35, 38 e 40°C) e em condições de alteração da temperatura em cultivos inicialmente expostos a 25°C com ajustes para 35 e 38°C durante o andamento dos cultivos. Foi observado que *A. dimorphus* pode tolerar altas temperaturas. O cultivo contínuo em 40°C causou a morte da cultura em apenas 3 dias, indicando que está temperatura está acima do ponto ótimo de crescimento para essa espécie. Nos cultivos com alteração da temperatura foi observado um aumento no tamanho celular em comparação com o cultivo contínuo em 25°C. Os maiores valores de biomassa, carboidratos e lipídeos foram observados no cultivo realizado continuamente em 35°C, onde o nível de espécies reativas de oxigênio (ROs), da peroxidação lipídica e de enzimas antioxidantes foram menores.

Outro fator importante que interfere na composição bioquímica e na produção de biomassa dos cultivos de microalgas é a riqueza de espécies dos chamados cultivos mistos (LOURENÇO, 2006; SMITH *et al.*, 2010; STOCKENREITER *et al.*, 2011).

O emprego de uma diversidade maior de espécies na mesma unidade de cultivo, pode atribuir uma série de vantagens aos cultivos em lagoas abertas, quando comparado ao cultivo unialgal (LOURENÇO, 2006; HANNON *et al.*, 2010; COPLIN, 2012). Cultivos unialgais a céu aberto estão sujeitos a uma série de fatores, como a entrada de novas espécies de microalgas e do zooplâncton trazidos por insetos, aves e até mesmo pelo ar e chuva, comprometendo a uniformidade da população e, conseqüentemente, a qualidade do produto final extraído (COPLIN, 2012). Além da maior estabilidade da cultura tem sido proposto que cultivos mistos usam melhor os

recursos disponíveis no meio e são potencialmente capazes de gerar maior quantidade de biomassa e lipídeos (SMITH *et al.*, 2010).

Entretanto, uma breve busca na literatura evidencia que pouco estudo é realizado com o foco de conhecer o comportamento de espécies selecionadas em cultivo misto com aplicação comercial. Phatarpekar *et al.* (2000) compararam o crescimento e a composição bioquímica das microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* em cultivo misto com as suas respectivas monoculturas e observaram no cultivo misto maiores concentrações de proteínas, carboidratos, lipídeos e clorofila 'a', nas fases exponencial e estacionária do crescimento, mesmo tendo densidade celular inferior aos cultivos unialgais. Os autores atribuíram esses resultados ao fato da competição por recursos estimular o acúmulo de componentes bioquímicos nas células, nas duas espécies ou em *C. calcitrans*, a qual foi dominante no cultivo misto.

Huang *et al.* (2011) estudaram o crescimento de *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas em conjunto sob três diferentes concentrações de nitrogênio (1,4, 14 e 140 mg/L) bem como o efeito de diferentes densidades de inoculação (10:0, 7:3, 5:5, 3:7 e 0:10). Foi observado um incremento em biomassa, clorofila 'a' e proteínas em todos os tratamentos nos cultivos com maior concentração de nitrogênio, em especial no cultivo misto na proporção de 7D:3P, onde foi observado um incremento de 132% e 2,8% nas concentrações de clorofila 'a' e proteínas, respectivamente.

Grande parte dos trabalhos apresentam cultivos mistos provindos de ambientes naturais, muitas vezes sem identificação prévia das espécies presentes. Ahmad *et al.* (2012) avaliaram o potencial de absorção de nutrientes de águas residuais e produção de biomassa, como potencial fonte para biocombustível, por um cultivo misto de algas coletadas no Jardim Botânico da Universidade de Lahore, contendo *Microspora* sp., *Lyngbya* sp., *Cladophora* sp., *Spirogyra* sp., *Rhizoclonium* sp. e diatomáceas. Foi relatado que o cultivo misto aumentou em biomassa através da absorção dos nutrientes disponíveis nas águas residuais de forma eficiente. E que essa biomassa é potencial matéria prima para a produção de biodiesel comparando os dados com a Norma Americana de Padronização de Biodiesel.

Outros trabalhos foram realizados utilizando comunidades mistas com diferentes enfoques, como por exemplo, teste de meios alternativos à base de fertilizantes

comerciais (BRITO *et al.*, 2013a; BRITO *et al.*, 2013b), atividades alelopáticas (GONÇALVES *et al.*, 2016) e cinética do crescimento e composição bioquímica (ARKRONRAT; DEEMARK; ONIAM, 2015).

Stockenreiter *et al.* (2012), indicam ocorrer aumento na produção de lipídeos por comunidades mistas naturais quando comparados aos cultivos realizados com apenas uma espécie. Smith *et al.* (2010) concluíram que comunidades naturais mais diversas, cultivadas em sistemas de lagoas abertas, podem acumular mais energia solar em forma de lipídeos, quando comparadas a comunidades unialgais cultivadas em fotobiorreatores controlados. Todavia, o uso de comunidades mistas naturais pode sofrer mudanças na composição, devido a relação de dominância entre as espécies ali presentes. As mudanças na composição provavelmente alterariam o teor e a qualidade dos lipídeos produzidos (COPLIN, 2012).

Com base nas informações supracitadas esta pesquisa buscou contribuir para a compreensão das respostas fisiológicas de microalgas em cultivos unialgais e mistos submetidos a diferentes temperaturas e a sua possível aplicabilidade, como forma de reduzir os custos, ainda elevados, da produção de compostos com base em microalgas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o cultivo unialgal e misto de *Pseudopediastrum boryanum* e *Scenedesmus obliquus*, realizado em escala laboratorial, em duas diferentes temperaturas, a fim de conhecer as respostas na produção em biomassa e na composição bioquímica (carboidratos, proteínas, lipídeos totais, perfil lipídico e pigmentos) dos cultivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o incremento em densidade e biomassa, a produção de lipídeos totais, de carboidratos, proteínas e pigmentos das microalgas em resposta aos cultivos unialgais e mistos;
- Investigar os possíveis efeitos da alteração da temperatura nas espécies estudadas, no que diz respeito ao seu crescimento e composição bioquímica;
- Caracterizar o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das microalgas estudadas;
- Avaliar seu potencial uso como fonte de esteres para a produção de biocombustíveis;
- Discutir acerca do potencial uso da biomassa obtida para cultivos comerciais e seus possíveis usos nas indústrias da alimentação animal, humana e da aquicultura;
- Contribuir para o conhecimento da fisiologia de *P. boryanum* e *S. obliquus* quando cultivadas conjuntamente;

3 HIPÓTESE DA PESQUISA

Com base no levantamento bibliográfico, o presente estudo parte da hipótese de que o cultivo misto de *P. boryanum* e *S. obliquus* na temperatura de 30°C apresentaria, ao fim do experimento, maior densidade celular, maior biomassa e maiores concentrações de lipídeos, proteínas e carboidratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

4.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS

As duas espécies de microalgas utilizadas no experimento foram selecionadas no banco de cultivo do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), com base em resultados obtidos anteriormente quanto ao seu teor de ácidos graxos, confirmando a potencialidade das espécies como fonte primária de ésteres para a fabricação de biodiesel, e após a realização de um teste piloto, no qual foram consideradas as características morfológicas e o possível polimorfismo das espécies quando em cultivo misto.

4.2 ESPÉCIES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

Pseudopediastrum boryanum (Turpin) E. Hegewald var. *boryanum* (Figura 03), pertencente à Classe Chlorophyceae, Família Hydrodictyceae e Gênero *Pseudopediastrum*, é uma alga colonial cenóbio orbicular plana e de vida livre, podendo conter 8, 16 ou 32 células. Não apresenta espaços intercelulares ou estes são muito pequenos e irregulares. As células marginais apresentam 2 prolongamentos da parede celular, lobos ou processos, delgados, curtos e com as extremidades levemente retusas e afinadas, arredondadas ou retas, possuem uma incisão ventral aberta em “U” ou “V” e são unidas às células internas pela base quadrangular. As células internas do cenóbio são cordiformes ou poligonais, mais largas que longas com margens arredondadas ou retas. Apresentam parede celular granulada, um plastídio parietal no formato da célula com um pirenoide central ou basal (SANT’ANNA, 1984; BICUDO; MENEZES, 2006; RESTANO, 2013).

É considerada uma espécie comum no fitoplâncton (KOMÁREK; FOTT 1983; BICUDO; MENEZES, 2006), com ampla plasticidade ecológica, cosmopolita, de ocorrência mundial, podendo ser encontrada em ambientes alcalinos até neutros. A espécie tolera ainda alto grau de trofia e saprobiedade, especialmente a variedade *boryanum* (PARRA, 1979).

Figura 03 – *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) E. Hegewald var. *boryanum*, cultivada em meio ASM1.



Fonte: Arquivo próprio, 2016.

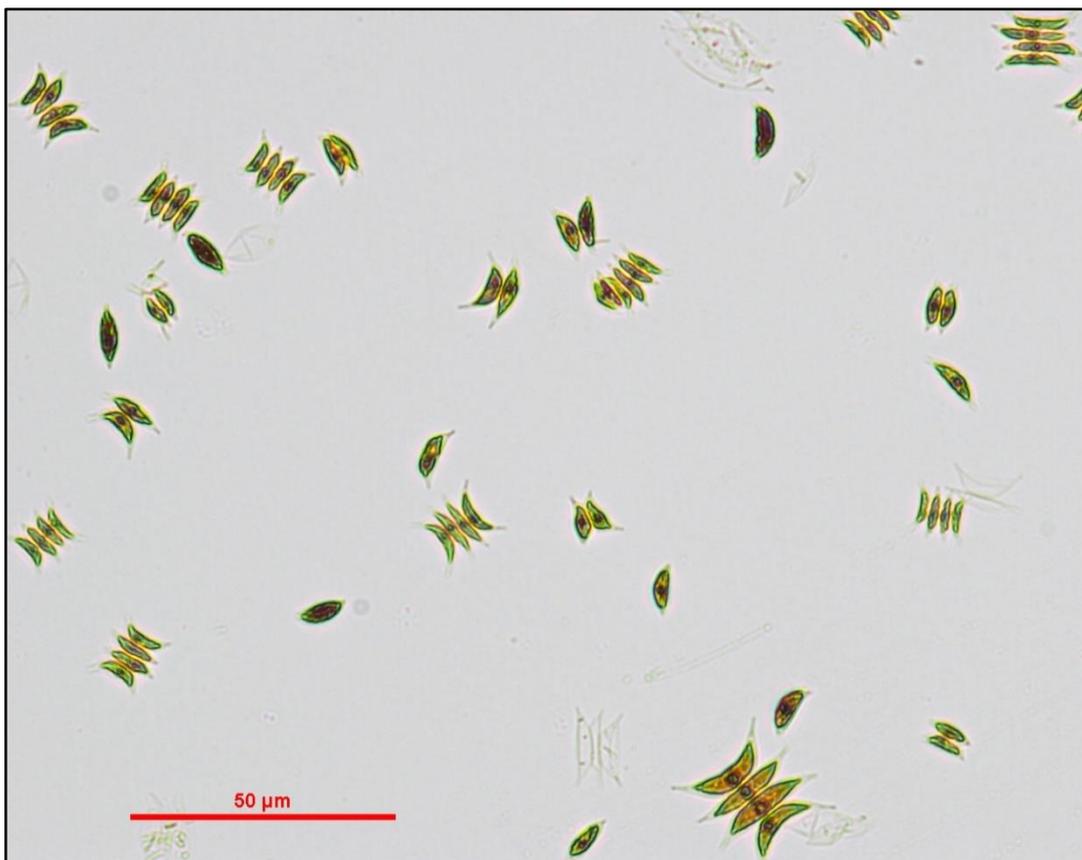
A reprodução desta espécie pode se dar tanto de forma assexuada quanto de forma sexuada, sendo a última muito rara, só ocorrendo em condições específicas de altas temperaturas e alta intensidade luminosa. Dois ciclos de reprodução assexuada podem ser observados; no mais comum, os zoósporos móveis são produzidos e liberados dentro de uma vesícula que se rompe apenas quando os zoósporos já formaram uma nova colônia juvenil de 16 células. No segundo ciclo, menos frequente, a vesícula se rompe logo após a sua liberação, soltando células individuais no meio. Tais células crescem individualmente e dão origem a uma nova colônia, através da produção de novos zoósporos móveis dentro de uma vesícula, seguindo o primeiro ciclo (PARK; CRAGGS; SHILTON, 2014).

Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing (Figura 04) pertence a Classe Chlorophyceae, Família Scenedesmaceae e Gênero *Scenedesmus*. É colonial

cenóbio, podendo ser formada por 4 ou 8 células, dispostas linearmente ou de maneira alternada. Suas células são fusiformes com polos agudos, células internas quase retas e células externas marcadamente côncavas, retas e até convexas. Possuem um único cloroplastídio que preenche toda a superfície interna da célula, com um pirenoide central (GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010; MENDES *et al.*, 2012). *S. obliquus* é a espécie com maior variabilidade morfológica dentro do gênero (GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010).

O Gênero *Scenedesmus* é considerado o mais comum e cosmopolita dos gêneros de algas verdes, além de serem pioneiros na colonização de novos ambientes. Sua reprodução é por formação de autósporos, entre 2 e 8, que por sua vez formam apenas um autocenóbio dentro da célula mãe, liberado através do rompimento de sua parede celular (BICUDO; MENEZES, 2006; GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010).

Figura 04 – *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kutzing cultivada em meio ASM1.



Fonte: Arquivo próprio, 2016.

4.3 DELINEAMETO EXPERIMENTAL E ESTATÍSTICO

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 3L, contendo 2,5 litros de meio, com aeração constante com volume de ar de 3,5 L/min, mantidos em estufas Eletrolab, modelo EL202/3, ajustadas às temperaturas de 20 e 30°C, no LATEAC/UFES. O meio utilizado para o cultivo foi o ASM1 adaptado de Gorham, Mclachlan e Hammer (1964), com o pH estabilizado inicialmente entre 7 +/- 0,05. O cultivo foi do tipo estanque ou batelada, sem aspersão de CO₂ e adição de mais nutrientes após inoculação. Os cultivos foram realizados em fotoperíodo de 12h de luz e escuro, com irradiância de 2000 lux, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e seu manuseio se deu em câmaras de fluxo laminar Pachane PCR T3. As condições de cultivo foram iguais e constantes para todos os tratamentos, em ambas as temperaturas.

Dessa forma, o experimento contou com três tratamentos por temperatura, realizados em triplicata.

O inóculo inicial, dia zero, foi de $1,5 \times 10^5$ Cel/mL para os cultivos unialgais, e $7,5 \times 10^4$ Cel/mL de cada espécie para os cultivos mistos, totalizando no final $1,5 \times 10^5$ Cel/mL. Uma sequência pré-determinada de rodizio dos erlenmeyers nas estufas incubadoras foi estabelecido para garantir a uniformidade das condições de cultivo (Figura 05). O experimento teve duração de 21 dias.

Para a realização deste estudo foi aplicado um delineamento fatorial 2x3, no qual foram testados o crescimento em biomassa, a produção de lipídeos totais, o teor de carboidratos totais, o teor de proteínas totais, e a concentração dos principais pigmentos (clorofila "a", carotenoides e feopigmentos) as duas espécies de microalgas pertencentes a Classe Chlorophyceae cultivadas em duas diferentes temperaturas em cultivos unialgais e mistos.

Figura 05 – Disposição dos erlenmeyers em uma das estufas utilizadas para o experimento.



Fonte: Arquivo próprio, 2016.

4.4 MEIO DE CULTURA

Para a realização deste experimento foi utilizado o meio de cultura ASM1 (GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964), caracterizado como definido, por ser preparado a partir de água de elevada pureza (no presente estudo foi utilizado água deionizada) à qual são adicionados diferentes elementos químicos, dentre esses macro e micronutrientes importantes para o desenvolvimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). O meio ASM1 possui 4 soluções estoque chamadas de A, B, C e D que são previamente preparadas (Tabela 01). Para a preparação final do meio de cultura as

soluções estoques são adicionadas em água de elevada pureza, como citado acima, nas proporções de 20 mL, 2mL, 0,1 mL e 0,4 mL para A, B, C e D, respectivamente.

Tabela 01 – Composição das soluções estoque do meio ASM 1. Concentrações de diluição em 200 mL para a Solução A e 100 mL para as Soluções B, C e D.

Solução A	Peso (g)	Solução B	Peso (g)	Solução C	Peso (g)	Solução D	Peso (g)
NaNO ₃ /NH ₄ Cl ₂	1,70	K ₂ HPO ₄	0,87	H ₃ BO ₃	2,48	EDTA. Na ₂	1,86
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49			FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29			ZnCl ₂	0,335		
				CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019		
				CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014		

Fonte: Adaptado de Gorham, Mclachlan e Hammer (1964).

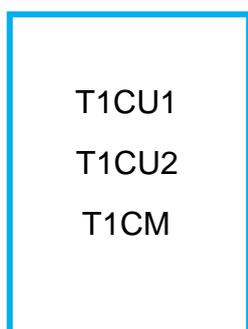
4.5 ESQUEMA DOS TRATAMENTOS

Foi testada a interação entre os fatores temperatura, 20 e 30°C, e duas diferentes cepas, ou espécies. Foram utilizadas cepas de *Scenedesmus obliquus* e *Pseudopediastrum boryanum* em cultivos unialgais e mistos.

Primeiro fator: Temperaturas (T1 e T2).

Segundo fator: Cultivo Unialgal espécie 1, cultivo unialgal espécie 2 e cultivo misto (CU1, CU2 e CM). O tratamento CM é o cultivo misto, ou seja, com as duas espécies (1 e 2).

Estufa 1 (20°C)



Estufa 2 (30°C)



4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Para a determinação do crescimento e densidade celular das unidades experimentais foram feitas contagens diretas em hemocitometro de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico Olympus CX41, com alíquotas retiradas a cada dois dias de experimento e fixadas com duas gotas de lugol acético diluído a 5%, seguindo a metodologia descrita por Lourenço (2006).

Para a quantificação da biomassa celular dos tratamentos seguiu-se o seguinte procedimento: alíquotas de 15 mL foram retiradas a cada 4 dias, filtradas em filtros de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 45 mm, previamente secos em estufa a 65 °C e pesados. Após filtragem, os filtros foram mantidos em estufa a 65 °C até atingirem peso constante.

A determinação da massa seca se dá através da subtração da massa final pela massa inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado. Os valores serão expressos em mg/L (LOURENÇO, 2006).

$$MS = (Mf - Mi) / V$$

Sendo,

MS: Massa seca;

Mf: Massa final;

Mi: Massa inicial e;

V: Volume filtrado.

4.7 ANÁLISES DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS E PIGMENTOS

Ao final do experimento a biomassa restante foi centrifugada, congelada e liofilizada para a realização das análises de carboidratos, proteínas, lipídeos totais e para a caracterização do perfil de ácidos graxos.

Para a quantificação das concentrações de proteínas totais solúveis usou-se o kit *Quick Start TM Bradford Protein Assay* da BIORAD que segue o método descrito por Bradford (1976). A biomassa liofilizada é macerada em nitrogênio líquido, em seguida

é transferido para um eppendorf onde adiciona-se 2 mL de solução tampão fosfato pH 5,5 para ser então centrifugado. Para a leitura em espectrofotômetro, 100 microlitros do sobrenadante foi adicionado ao tubo de ensaio contendo 5 mL do reagente, o qual foi diluído anteriormente em água deionizada, na proporção de 1:4. O tubo é agitado em vortex e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura da absorbância é realizada no comprimento de onda de 595 nm. Para os pontos da curva padrão foram realizadas 5 diluições compreendidas na faixa de 0,2 a 0,9 mg/mL de albumina.

A extração e a determinação das concentrações dos carboidratos totais foram realizadas seguindo o procedimento descrito inicialmente por Dubois *et al.* (1956) e modificado por Cuzzuol e Clippel (2009). Para a obtenção da curva padrão foi preparada uma solução estoque contendo 100 mg de glicose e 100 mL de água deionizada. A partir da solução estoque foi preparada a solução mãe, onde 10 mL da solução estoque foi diluída em 100 mL de água deionizada. Os pontos da curva padrão são então lidos utilizando a solução mãe. Para a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm, foram adicionados a um tubo de ensaio 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 0,5 mL de fenol 5% e 0,5 mL da amostra, ou ponto de curva. Os tubos eram resfriados em água com gelo antes da leitura.

A quantificação da clorofila 'a', feopigmentos e dos carotenoides por meio da espectrofotometria foi realizada duas vezes durante o experimento. No meio do experimento, dia 10 de cultivo, e no final, dia 21 de cultivo, seguindo a metodologia descrita por Lourenço (2006). Uma alíquota de 15 mL foi retirada de cada tratamento e filtrada em filtro de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 45 mm. A extração dos pigmentos se deu através da trituração dos filtros de fibra de vidro, com o material retido, usando acetona 90% como solvente a frio. Após a maceração a solução foi acondicionada em tubos de centrifuga envoltos por papel alumínio e armazenados a 4°C por 24h. Passado o tempo de incubação a solução foi centrifugada e o sobrenadante lido em espectrofotômetro nos comprimentos de onda recomendados para a detecção dos picos de absorção dos pigmentos de interesse. Todo o processo foi realizado na ausência de luz.

Para a determinação da concentração de clorofila 'a' foi utilizada a equação proposta por Lorenzen (1967); e a equação desenvolvida por Strickland e Parsons (1968) para determinação da concentração dos carotenóides totais.

4.8 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS E DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos totais foram extraídos usando o método descrito por Bligh & Dyer (1959). O macerado liofilizado foi suspenso em tampão PBS e, em seguida, adicionou-se 42 μL da solução contendo o padrão interno, composto por 5 mg/mL de tritridecanoína em hexano (C13:0, T3882 Sigma), e 4,15 mL de clorofórmio, metanol e água, na proporção de 2:2:1. A mistura foi centrifugada e a fase clorofórmica foi transferida para outro frasco e seca sob atmosfera de N_2 (g). O conteúdo total de lipídeos foi determinado gravimetricamente e o resíduo de gordura foi transmetilado para a avaliação do conteúdo de ácidos graxos.

A reação de metilação dos ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; fatty acid methyl ester) foi feita dissolvendo-se o extrato seco de lipídeos em 500 μL de BF_3 (7% em metanol) e a mistura foi incubada por 1h a 100 $^\circ\text{C}$. Após o término da reação, deixou-se esfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 1,25 mL de água e extraíram-se os FAME com 500 μL de hexano.

Os FAME foram analisados por CG-EM, em coluna capilar de sílica fundida (VF-Wax, com dimensões de 30 m, 0,25 mm, 0,25 m de espessura do filme, Agilent). A temperatura de injeção foi de 220 $^\circ\text{C}$, volume de 1 μL , no modo Split. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, e a seguinte rampa de temperatura: temperatura inicial de 60 $^\circ\text{C}$, com aumento de 5 $^\circ\text{C}$ por min, até 260 $^\circ\text{C}$, mantidos por 10 min.

O padrão utilizado para a identificação dos picos foi o Supelco 37 (47885-U). Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e/ou por comparação de seus espectros de massa com espectros da biblioteca (NIST). Os FAME que não constavam no padrão e que apresentaram índice de similaridade abaixo de 90% não foram considerados.

A quantificação da maioria dos FAME foi feita com a equação da reta da curva padrão do respectivo FAME do padrão Supelco 37. Para os FAME que não constavam no padrão supelco, a quantificação foi feita considerando a concentração do padrão interno (C13:0), uma vez que área do pico é proporcional a concentração de FAME.

4.9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados de densidade celular obtidos foram utilizados para produzir o modelo de curva de crescimento para cada tratamento. E para se calcular as taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo das cepas. Como base para os cálculos das taxas de crescimento foram utilizados os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento dos tratamentos.

A taxa de crescimento (μ) e tempo médio de duplicação (G) foram calculados segundo as equações descritas primariamente por Fogg e Thake (1987):

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

Sendo,

μ = velocidade específica do crescimento;

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 .

A partir do μ foi possível calcular o tempo médio de duplicação:

$$G = \ln(2) / \mu$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da equação:

$$R = R_1 - R_0,$$

Sendo,

R_1 = número máximo de células/mL;

R_0 = número inicial de células/mL.

4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos nas análises de crescimento, massa seca, proteínas hidrossolúveis, lipídeos totais, carboidratos totais, pigmentos e no perfil de ácidos graxos foram submetidos a análise de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância ANOVA Fatorial 2x3 e, ao teste a posteriori de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa utilizado para a realização dos testes foi o ASSISTAT versão 7.7 beta.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- AHMAD, Farooq; KHAN, Amin U.; YASAR, Abdullah. Uptake of Nutrients from Municipal Wastewater and Biodiesel Production by Mixed Algae Culture. **Pakistan J. Of Nutrition**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.648-652, 1 jul. 2012. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/pjn.2012.648.652>.
- ALABI, A. O.; TAMPIER, M.; BIBEAU, E. **Microalgae technologies & processes for biofuel/bioenergy production in british columbia**. [s.l.]: Seed Science, 2009.
- ARKRONRAT, W.; DEEMARK, P.; ONIAM, V. Growth performance and proximate composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. & *Tetraselmis* sp.) with monocultures. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, Tailândia, v. 1, n. 38, p.1-5, jan. 2016.
- BECKER, W. **Microalgae for human and animal nutrition**, In: Richmond A, Hu Q (eds), Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second ed., John Wiley and Sons, Ltd., Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, p.461-503, 2013.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 566p. 2004.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, [s.l.], v.38, n.1, 2008.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do brasil: Chave para identificação e descrições**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, [s.l.], v. 37, p.911-917, 1959.
- BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae: Structure and reproduction**, Ed. Prentice-Hall, 720p., 1985.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, p.248-254. 1976
- BRITO, Diagnora et al. Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. **The Annals Of The University Dunarea de Jos Of Galati**, Venezuela, v. 1, n. 6, p.85-97, ago. 2013a.
- BRITO, Diagnora et al. Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Interciência**, Caracas, v. 38, n. 8, p.604-608, ago. 2013b.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, v. 25, p.294-307, fev. 2007.
- CHOKSHI, Kaumeel et al. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 180, p.162-171, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.102>.

- CLIFFORD, C. B. **Design of Algae Farms**. 2015. Disponível em: <<https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/695>>. Acesso em: 10 ago. 2016.
- COPLIN, L. G. (Ed.). **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington: The National Academies Press, 2012.
- CUZZUOL, G. R. F.; CLIPPEL, J. K. Aspectos ecofisiológicos de *Sinzingia aghensis* Chautems em condições de campo. **Hoehnea**, Vitória, v. 1, n. 36, p.73-81, jan. 2009.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.
- DISMUKES, G. C. et al. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 19, n.3, p. 235–240, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 350 - 356, 1956.
- ESTEVEZ, F. de A. **Fundamento de limnologia**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Interciência, 791p., 2011.
- FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**. 3.ed. London: University of Wisconsin Press, 269p., 1987.
- FOTT, B. **Algenkunde**. 2 ed. Hufthgar: Gustav Fischer Verlag. 581p., 1971.
- GODINHO, L. R.; GONZÁLEZ, A.A.C.; BICUDO, C.E.M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmeceae). **Hoehnea**, São Paulo, p.513-533, ago. 2010.
- GONÇALVES, A. L. et al. Co-cultivation of *Synechocystis salina* and *Pseudokirchneriella subcapitata* under varying phosphorus concentrations evidences an allelopathic competition scenario. **Rsc Adv.**, [s.l.], v. 6, n. 61, p.56091-56100, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra07771d>.
- GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, R. W.; HAMMER, U. T. **Isolation and culture of toxic strains of Anabaena**, flos-aquae Breb. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh., v. 19, p. 796–804, 1964.
- GUILLARD, R. R. L.; MORTON, S. L. **Culture Methods**. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, Paris, p.77-97, 2003.
- HANNON, M. J. et al. Biofuels from algae: Challenges and potential. **Biofuels**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.763-784, 2010.
- HARWOOD, J. L.; GUSCHINA, I. A. Regulation of lipid synthesis in oil crops. **Febs Letters**, [s.l.], v. 587, n. 13, p.2079-2081, 16 maio 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.018>.
- HUANG, W. et al. Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricorutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations. **African Journal Of Biotechnology**, Shanghai, v. 10, n. 61, p.13164-13174, 10 out. 2011.
- KOLLER, M. Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. **Algal Biorefineries**. Springer International Publishing, p.133-186, 2015.

- KOMÁREK, J. & FOTT, B. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. *In*: Huber-Pestalozzi, G. (ed.) Das Phytoplankton des Süßwassers. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele und Obermiller). v. 7, n. 1, p.1044, 1983
- LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.**, v. 12, p.343-346, 1967.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.
- MENDES, M. C. Q. *et al.* Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Act Botanica Brasilica**, Salvador, v. 3, n. 26, p.691-696, jun. 2012.
- MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. **Journal of Applied Pyrolysis**, [s.l.], v.71, No.2004, p. 855-863, 2004.
- MILLEDDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.31-41, 2011.
- PARK, J. B. k.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Investigating the life-cycle and growth rate of *Pediastrum boryanum* and the implications for wastewater treatment high rate algal ponds. **Water Research**, [s.l.], v. 60, p.130-140, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.028>.
- PARRA, B. O. Revision der Gattung *Pediastrum* Meyen (Chlorophyta). **Bibliotheca Phycol.**, [s.l.], v. 48, p.1-186, 1979.
- PAULILLO, L. C. M. S.; JATOBÁ, F. H. P.; CECHINEL, C. A. Biodiesel: Eficiência energética e impacto ambiental. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**. Ano III. n. 11. 2009.
- PHATARPEKAR, P. V. *et al.* A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. **Aquaculture**, India, v. 181, p.141-155, jan. 2000.
- RAFIQUL, I. M. *et al.* Salt stress culture of blue green algae *Spirulina fusiformis*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 6, p. 648-650, 2003.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830p., 2007.
- RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, [s.l.], v. 211, p.195-214, 2002.
- RESTANO, A. M. L. **Família Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae) no Estado de São Paulo: levantamento florístico**. 2013. 164 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.
- REYNOLDS, C. S. **The ecology of phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press. 535p., 2006

- RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- RICHMOND, A. Microalga biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. **Applied Phycology**, [s.l.], v. 12, p.441-451, 2000.
- SANT'ANNA, C. L. Chlorococcales (Chlorophyceae) do estado de São Paulo, Brasil. **Bibltica Phycol.**, [s.l.], v. 67, p.1-348, 1984.
- SAYEGH, F. A. Q.; MONTAGNES, D. J. S. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3007-3013, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.011>.
- SMITH, V. H.; STURM, B. S. M.; DE NOYELLES, F. J.; BILLINGS, S. A. The ecology of algal biodiesel production. **Trends Ecol Evol**, [s.l.], v. 25, p.301–309, 2010.
- STOCKENREITER, M. *et al.* The effect of species diversity on lipid production by micro-algal communities. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 24, p.45-54, 2012.
- STRIKLAND, J. D. H; PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis. **Bull. Fish. Res. Bd Can.**, [s.l.], v. 167, p.1-311, 1968.
- TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006, Brasília. **Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, DF: MCT/ABIPTI, p.91-96, 2006.
- THOMPSON, P. A.; GUO, M.; HARRISON, P. J. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **J. Phycol**, [s.l.], v. 28, 481–488, 1992.

CAPÍTULO 1

Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica

Frederico Pacheco Militão^{a,*} e Valéria de Oliveira Fernandes^a

^aUFES – universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Fernando Ferrari, 514, CCHN/PPGBV, Goiabeiras, Vitória – ES, 29075-910, Brasil

*fredericomilitao@gmail.com

ABSTRACT

The microalgal biomass has several commercial applications, especially in the pharmaceutical, food, animal feed and, more recently, the biofuels industry. The use of microalgae populations in mixed cultures can provide advantages such as cost reduction with contamination and obtaining biomass rich in lipids, carbohydrates and proteins. This study aimed to evaluate the unialgal and mixed cultivation of *Pseudopediastrum boryanum* and *Scenedesmus obliquus* at two different temperatures, in laboratory scale, in terms of biomass and biochemical composition. The experiment was conducted in triplicate, in temperatures set of 20 and 30°C, medium ASM1, photoperiod 12/12h and continuous aeration for 21 days. The inoculum was $1,5 \times 10^5$ cell/mL to monocultures and $7,5 \times 10^4$ cell/mL, of each species, in mixed culture. Increased cell density (13.6×10^6 cell/mL) and biomass (55 g/L) were recorded in unialgal *S. obliquus* culture at 30°C. High protein concentrations (672.6 mg/g) were observed in P20 and S20 treatments and carbohydrates (6.17 mg/g) in P30. There was no significant difference in total lipid content extracted in S20 (95.5 mg/g), P20 (96.3 mg/g) and M20 (105.3 mg/g). FAMES composition of the microalgae, varied significantly as regards the number of unsaturations, being mostly composed of monounsaturated fatty acids (14 to 41.8%) and tri-unsaturated fatty acids (18.8 to 33.2%). Based on the results, it is concluded that the mixed cultivation of *S. obliquus* and *P. boryanum* not shown good results of growth and production of biochemicals. Changes in temperature affect the growth and yield of most biocompounds but, this influence differs between treatments. The FAMES profile doesn't fit the rules in force for production of biofuels, however, the biomass rich in protein and essential fatty acids (Omega 3), suggesting a potential use as a supplement in human food and animal feed production.

Keywords: Mixed cultivation, temperature, feeding, biofuels.

1 INTRODUÇÃO

Em se tratando de metabolismo primário, microalgas são organismos extremamente eficientes, capazes de converter dióxido de carbono, energia solar e elementos inorgânicos, como o nitrogênio e o fósforo, em biomassa nutricionalmente rica em lipídeos, carboidratos e proteínas (BECKER, 2013; DISMUKES *et al.*, 2008).

Microalgas, por se reproduzirem, em sua maioria, por divisão celular simples, possuem alta taxa de crescimento, apresentarem grande diversidade metabólica e alta plasticidade ecológica, sendo capazes de se adaptarem a diferentes condições ambientais (LOURENÇO, 2006; HANNON *et al.*, 2010), são facilmente cultiváveis. Tais características aliadas ao fato de que seu cultivo não depende de áreas produtivas para ser implementado, não competindo, dessa forma, com áreas férteis destinadas a produção de alimentos, além de algumas espécies produzirem uma grande quantidade de óleo, faz com que esse grupo de organismos seja considerado como fonte sustentável de ácidos graxos para a produção de biocombustíveis, servindo como alternativa para a substituição dos combustíveis fósseis e dos biocombustíveis produzidos à base de plantas oleaginosas (OHSE, 2007).

Atualmente, o cultivo de microalgas em escala comercial é realizado em lagoas abertas ou em fotobiorreatores fechados (CHISTI, 2007), sendo as lagoas abertas o sistema de produção mais comum em operação, devido, principalmente, ao baixo custo necessário para sua implantação, manutenção e aumento em escala (COPLIN, 2012; MILLEDGE, 2011).

Embora a maioria dos esforços estejam voltados para a busca de espécies resistentes e altamente produtoras de lipídeos e na utilização dessas microalgas como fonte de matéria prima para a obtenção de ácidos graxos capazes de serem convertidos em biodiesel, o custo desse biocombustível a base de microalgas, chamado de terceira geração, ainda não é considerado economicamente viável (CLARENS *et al.*, 2010; MILLEDGE, 2011; BECKER, 2013; SORATANA; BARR; LANDIS, 2014), estando estimado entre U\$ 9 e U\$ 25 por galão de óleo extraído de cultivos realizados em lagoas abertas e entre U\$ 15 e U\$ 40 por galão do mesmo óleo extraído de microalgas cultivadas em fotobiorreatores fechados (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013).

Uma das possibilidades para tornar o valor do biocombustível, a base de alga, competitivo no mercado energético, é o aproveitamento de toda a biomassa gerada,

após a extração dos ácidos graxos, para a exploração de outros biocompostos de grande interesse comercial, como por exemplo proteínas, carboidratos e pigmentos, os quais representam uma fração significativa da biomassa residual. Estes subprodutos são facilmente utilizados por setores industriais secundários como os da alimentação animal e da aquicultura (DISMUKES *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2009; KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013; HANNON *et al.*, 2010).

Para tal, as condições de cultivo podem ser alteradas para otimizar ou induzir a produção de maiores concentrações de biocompostos de interesse, bem como o aumento da própria biomassa gerada (LOURENÇO, 2006), uma vez que a composição bioquímica das microalgas é variável (MIAO; WU, 2004). Muitas pesquisas têm investigado a manipulação de fatores como a limitação de nutrientes e utilização de meios alternativos de cultura (BAUMGARTNER *et al.*, 2013), diferentes intensidades luminosas (GUO *et al.*, 2015), diferentes gradientes de salinidade (RUANGSOMBOON, 2012) e temperatura (XIN; HONG-YING; YU-PING, 2011; CONVERTI *et al.*, 2009) como forma de estresse para otimizar a produção nos cultivos.

Entre os fatores acima mencionados a temperatura é o que mais afeta o crescimento em biomassa e nas atividades metabólicas desses microrganismos, tendo influência direta na produção de lipídeos, proteínas e compostos fenólicos (LOURENÇO, 2006; XIN; HONG-YING; YU-PING, 2011).

A temperatura ideal para o cultivo varia em função das espécies presentes e também em função da finalidade do cultivo. Lourenço (2006) sugere que, para microalgas de ambientes tropicais, a faixa de temperatura ótima para cultivo está entre 20 e 25°C, já Lopes (2007) estipula a faixa entre 25 e 35°C, para algas nos mesmos ambientes.

O emprego de maior variedade de espécies na mesma unidade de cultivo, denominado de cultivo misto ou co-cultivo, pode atribuir uma série de vantagens aos cultivos em lagoas abertas, quando comparado ao cultivo unialgal (LOURENÇO, 2006; HANNON *et al.*, 2012; COPLIN, 2012). Cultivos unialgais a céu aberto estão sujeitos a uma série de fatores como a entrada de novas espécies de microalgas e do zooplâncton trazidos por insetos, aves e até mesmo pelo ar e chuva, comprometendo a uniformidade da população e, conseqüentemente, a qualidade do produto final extraído (COPLIN, 2012). Além da maior estabilidade da cultura, os cultivos mistos

usam melhor os recursos disponíveis no meio e são potencialmente capazes de gerar maior quantidade de biomassa e lipídeos (SMITH *et al.*, 2010).

Stockenreiter *et al.* (2012), relataram o aumento na produção de lipídeos por comunidades mistas naturais quando comparados aos cultivos realizados com apenas uma espécie. Smith *et al.* (2010) também afirmaram que comunidades naturais mais diversas, cultivadas em sistemas de lagoas abertas, podem acumular mais energia solar em forma de lipídeos, quando comparadas a comunidades unialgais cultivadas em fotobiorreatores controlados. Todavia, o uso de comunidades mistas naturais pode sofrer mudanças na composição, devido a relação de dominância entre as espécies ali presentes. As mudanças na composição provavelmente alterariam o teor e a qualidade dos lipídeos produzidos (COPLIN, 2012).

As incertezas sobre se as monoculturas são realmente mais produtivas em termos de acumulação de lipídeos e produção de outros bioprodutos do que cultivos mistos com espécies selecionadas permanece, associado à problemática da realização destes cultivos em sistemas de lagoas abertas *outdoor*, comercialmente menos custosos.

Diante do exposto, a presente pesquisa justifica-se pela necessidade do barateamento dos custos, ainda elevados, da comercialização de compostos produzidos por microalgas, através da otimização das formas de cultivo e da identificação de cepas/espécies ótimas para a obtenção dos mesmos, contribuindo para elucidar aspectos importantes a respeito de cultivos mistos, ainda pouco estudados com essa finalidade.

O presente estudo, portanto, visou avaliar o cultivo unialgal e misto de *Pseudopediastrum boryanum* e *Scenedesmus obliquus* em duas diferentes temperaturas, em escala laboratorial, em termos da biomassa e da composição bioquímica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS

As duas espécies de microalgas utilizadas no experimento, *Pseudopediastrum boryanum* e *Scenedesmus obliquus* foram selecionadas no banco de cultivo do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Ambas foram isoladas a partir de amostras de fitoplâncton coletadas na Lagoa Juara, um ambiente dulcícola, localizada na cidade da Serra, no sul do estado do Espírito Santo, Brasil.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 3L, contendo 2,5 litros de meio, com aeração constante de 3,5 L/min de ar, mantidos em estufas ajustadas às temperaturas de 20 e 30°C, no LATEAC/UFES. O meio utilizado para o cultivo foi o ASM1 adaptado de Gorham, Mclachlan e Hammer (1964), com o pH estabilizado inicialmente entre 7 +/- 0,05. O cultivo foi do tipo estanque ou batelada, sem aspensão de CO₂ e sem adição de mais nutrientes após inoculação, em fotoperíodo de 12h de luz e escuro com irradiância máxima de 2000 lux. O experimento contou com três tratamentos por temperatura, realizados em triplicata, totalizando 18 unidades experimentais.

O inóculo inicial (dia zero) foi de $1,5 \times 10^5$ Cel/mL⁻¹ para os cultivos unialgais, e $7,5 \times 10^4$ Cel/mL⁻¹ de cada espécie para os cultivos mistos, totalizando no final $1,5 \times 10^5$ Cel/mL⁻¹. Uma sequência pré-determinada de rodizio dos erlenmeyers nas estufas incubadoras foi estabelecida para garantir a uniformidade das condições de cultivo. O experimento teve duração de 21 dias.

2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Para a determinação do crescimento e densidade celular das unidades experimentais foram feitas contagens diretas em hemocitometro de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico Olympus CX41, com alíquotas retiradas a cada dois dias de experimento e fixadas com duas gotas de lugol acético diluído a 5% (LOURENÇO, 2006).

Para a quantificação da biomassa celular dos tratamentos seguiu-se o seguinte procedimento: alíquotas de 15 mL foram retiradas a cada 4 dias, filtradas em filtros de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 45 mm previamente secos em estufa a 65 °C e pesados. Após a filtração, os filtros foram mantidos em estufa a 65 °C até se atingir peso constante. O resultado final foi dado pela subtração do peso final, pelo peso inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado, os valores são expressos em mg/L (LOURENÇO, 2006).

Como base para os cálculos das taxas de crescimento foram utilizados os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento de cada tratamento. A taxa de crescimento (**K**) e tempo médio de duplicação (**G**) foram calculados segundo as equações descritas primariamente por Fogg e Thake (1987). Para a taxa de crescimento temos $K = (\ln N_2 - \ln N_1) / (T_2 - T_1)$, sendo N1 e N2 o número de células nos tempos T₁ e T₂. Tendo os valores de **K**, calculou-se o tempo médio de duplicação sendo, $G = \ln(2) / K$. O rendimento máximo foi calculado pela subtração do maior valor de densidade obtido (cél.mL⁻¹) pelo valor inicial inoculado.

2.4 CARBOIDRATOS, PROTEINAS, LIPÍDEOS TOTAIS E PIGMENTOS

A extração e a determinação das concentrações dos carboidratos totais foram realizadas seguindo o procedimento descrito inicialmente por Carvalho *et al.* (1997) e modificado por Cuzzuol e Clippel (2009). A quantificação das concentrações de proteínas totais solúveis usou-se o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* da BIORAD que segue o método descrito por Bradford (1976).

Os lipídeos totais foram extraídos e dosados usando o método proposto primariamente por Bligh & Dyer (1959).

Clorofila 'a' e carotenoides totais foram extraídos de acordo com o método proposto por Lourenço (2006) o qual utiliza acetona 90% como solvente. Para a determinação da concentração de clorofila 'a' foi utilizada a equações proposta por Lorenzen (1967); e a equação desenvolvida por Strickland e Parsons (1968) para determinação da concentração dos carotenoides totais.

2.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O macerado liofilizado foi suspenso em tampão PBS e, em seguida, adicionou-se 42 μL da solução contendo o padrão interno, composto por 5 mg/mL de tritridecanoína em hexano (C13:0, T3882 Sigma), e 4,15 mL de clorofórmio, metanol e água, na proporção de 2:2:1. A mistura foi centrifugada e a fase clorofórmica foi transferida para outro frasco e seca sob atmosfera de N_2 (g). O conteúdo total de lipídeos foi determinado gravimetricamente e o resíduo de gordura foi transmetilado para a avaliação do conteúdo de ácidos graxos.

A reação de metilação dos ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; fatty acid methyl ester) foi feita dissolvendo-se o extrato seco de lipídeos em 500 μL de BF_3 (7% em metanol) e a mistura foi incubada por 1h a 100 °C. Após o término da reação, deixou-se esfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 1,25 mL de água e extraiu-se os FAME com 500 μL de hexano.

Os FAME foram analisados por CG-EM, em coluna capilar de sílica fundida (VF-Wax, com dimensões de 30 m, 0,25 mm, 0,25 m de espessura do filme, Agilent). A temperatura de injeção foi de 220 °C, volume de 1 μL , no modo Split. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, e a seguinte rampa de temperatura: temperatura inicial de 60 °C, com aumento de 5 °C por min, até 260 °C, mantidos por 10 min.

O padrão utilizado para a identificação dos picos foi o Supelco 37 (47885-U). Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e/ou por comparação de seus espectros de massa com espectros da biblioteca (NIST). Os FAME que não constavam no padrão e que apresentaram índice de similaridade abaixo de 90% não foram considerados.

A quantificação da maioria dos FAME foi feita com a equação da reta da curva padrão do respectivo FAME do padrão Supelco 37. Para os FAME que não constavam no padrão supelco, a quantificação foi feita considerando a concentração do padrão interno (C13:0), uma vez que área do pico é proporcional a concentração de FAME.

2.6 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS

Os dados obtidos nas análises de crescimento, massa seca, proteínas hidrossolúveis, lipídeos totais, carboidratos totais, pigmentos e no perfil de ácidos graxos foram submetidos a análise de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância ANOVA Fatorial 2x3 e, ao teste a posteriori de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa utilizado para a realização dos testes foi o ASSISTAT versão 7.7 beta.

3 RESULTADOS

3.1 Crescimento e massa seca

As fases de crescimento apresentaram diferentes dias de duração de acordo com a temperatura e a forma de cultivo empregada. Para o cálculo da taxa de crescimento e tempo de duplicação foram utilizados os valores de densidade celular correspondentes ao início e ao final da fase exponencial de crescimento de cada tratamento (Tabela 01).

Tabela 01 – Parâmetros de crescimento (taxa de crescimento - K, tempo de duplicação - G e rendimento máximo - R_{máx}) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (log) dos tratamentos.

	K (d⁻¹)	G (Dias)	R_{máx} (Células/mL¹)	Duração da Fase Log (dias)
P30	0,72 aA	0,99 aB	2.258.333 aC	3-5
S30	0,13 bB	5,29 aA	13.666.667 aA	1-19
M30	0,13 bB	5,73 aA	9.158.836 aB	1-19
P20	0,39 bA	1,79 aB	2.243.333 aC	3-9
S20	0,21 aB	3,25 bA	10.940.000 aA	1-21
M20	0,21 aB	3,49 bA	6.417.520 bB	1-21

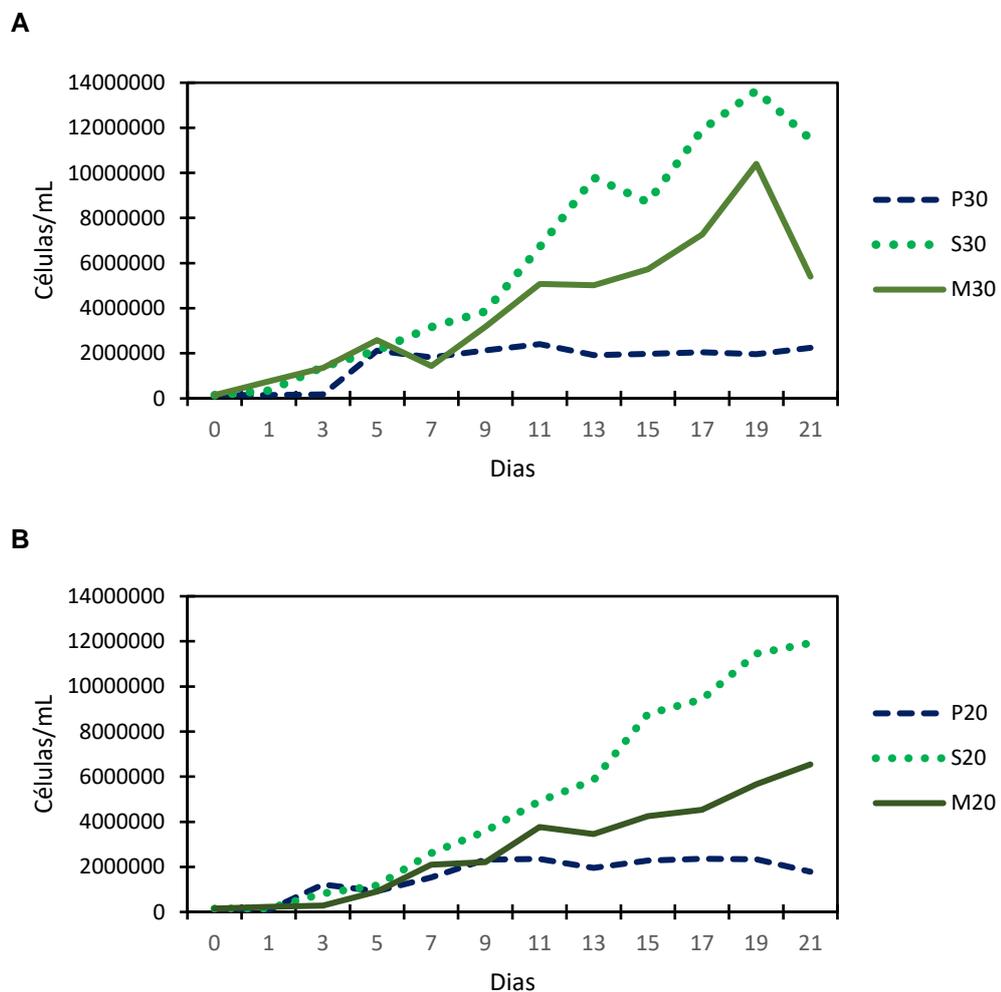
* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%. Letras minúsculas comparam o respectivo tratamento em ambas as temperaturas e letras maiúsculas os tratamentos dentro da mesma temperatura. ** Para taxa de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo $P < 0,1$. ***P30, S30 e M30 correspondem a *P. boryanum*, *S. obliquus* e o cultivo misto em 30°C, assim como P20, S20 e M20 correspondem a *P. boryanum*, *S. obliquus* e o cultivo misto em 20°C.

Os cultivos P30 e P20 foram os únicos a apresentarem fase de indução ao crescimento, com duração de 2 dias, e fase estacionária de crescimento iniciada no dia 5 e 9 em P30 e P20, respectivamente. Os cultivos S20 e M20 não apresentaram

fase de adaptação e permaneceram na fase exponencial de crescimento até o último dia do cultivo. Os cultivos S30 e M30 também não apresentaram fase de adaptação ao meio, mas mostraram indícios de entrada na fase de crescimento estacionário a partir do dia 19 (Figura 01).

Para os parâmetros taxa de crescimento e tempo de duplicação a interação com o fator temperatura foi significativa ($P < 0,1$) enquanto que o rendimento máximo, embora tenha tido diferença significativa entre os tratamentos, não mostrou interação com a temperatura.

Figura 01 – Curva de crescimento dos cultivos unialgais e mistos de *P. boryanum* e *S. obliquus* nas temperaturas de 30°C (A) e 20°C (B). Médias de densidade celular.



Fonte: elaboração própria, 2016.

Os valores de massa seca, apresentados na tabela 02, correspondem aos dias 05, 10, 13, 17 e 21 de cultivo. Houve um incremento significativo em biomassa, em

comparação aos dias 05 e 21, em todos os tratamentos. Sendo S30 e S20 os cultivos com maior biomassa ao final do experimento, 0,55 e 0,56 g/L, respectivamente. E os cultivos P30, M30 e M20 com menor biomassa, 0,40, 0,37 e 0,42 g/L, respectivamente.

De modo geral, a interação entre a temperatura e o incremento em biomassa nos tratamentos não se mostrou significativa.

Tabela 02 – Análises de biomassa (massa seca) durante o cultivo.

	Massa seca (g/L)*				
	1	2	3	4	5
P30	0,16 aAd	0,21 aAc	0,25 aAc	0,30 bAb	0,40 bBa
S30	0,04 aBd	0,15 aBc	0,18 aBc	0,27 bAb	0,55 aAa
M30	0,08 bBd	0,15 aBc	0,27 aAb	0,32 aAb	0,37 aBa
P20	0,09 bAe	0,16 bAd	0,22 aBc	0,36 aAb	0,48 aBa
S20	0,03 aBd	0,15 aAc	0,20 aBc	0,33 aAb	0,56 aAa
M20	0,12 aAc	0,15 aAc	0,28 aAb	0,27 aBb	0,42 aCa

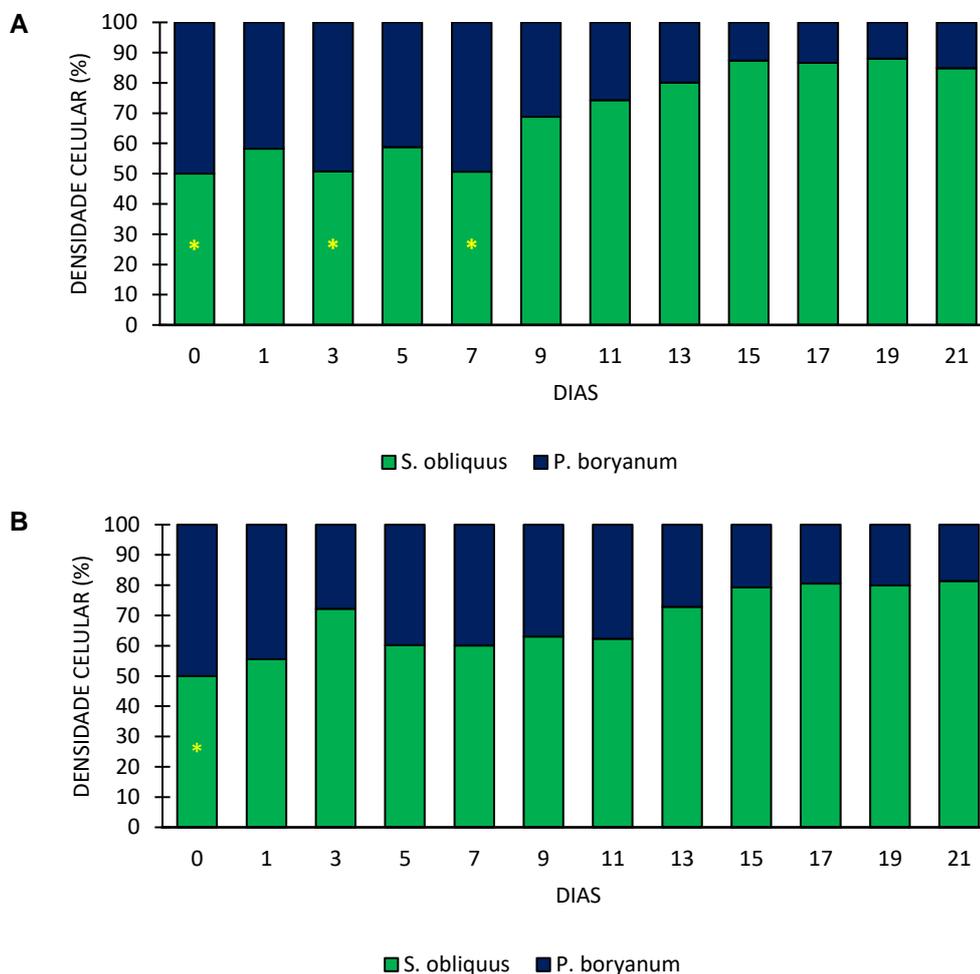
* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas comparam o respectivo tratamento em ambas as temperaturas, letras maiúsculas os tratamentos dentro da mesma temperatura e letras minúsculas em itálico os tratamentos na mesma temperatura nos diferentes tempos. **Para os dados de massa seca temos $P < 0,1$.

A composição do cultivo misto variou em ambas as temperaturas, no que diz respeito a densidade celular entre as espécies ali presentes, no decorrer dos dias (Figura 02).

A análise estatística das porcentagens, indicando a representatividade de cada população na cultura mista, mostrou haver diferença significativa entre a densidade das espécies desde o primeiro dia no cultivo M20 onde, *S. obliquus* e *P. boryanum* corresponderam a 56% e 44%, respectivamente, da densidade celular total do tratamento. No cultivo M30 as populações apresentaram pequenas oscilações, sendo, estatisticamente diferentes nos dias 1 e 5, e iguais nos dias 3 e 7, de cultivo. Do nono dia em diante a população de *S. obliquus* (69%) se manteve sempre mais expressiva que a população de *P. boryanum* (31%).

Por mais que o cultivo misto, como comunidade, nas temperaturas de 30 e 20°C, não tenha demonstrado entrada na fase estacionária de crescimento ao final do experimento, as populações de *P. boryanum* e *S. obliquus* mantiveram seu crescimento constante a partir do dia 15 de cultivo, com pouca ou nenhuma alteração em suas densidades.

Figura 02 – Variações na densidade celular, em porcentagem, das populações de *P. boryanum* e *S. obliquus* nos cultivos mistos em de 30°C (A) e 20°C (B).



Dias marcados com um () não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% e probabilidade.

3.2 Carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis e lipídeos totais

Os valores obtidos nas análises de carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis e lipídeos totais dos cultivos unialgais e mistos das microalgas *P. boryanum* e *S. obliquus*, nas temperaturas de 20 e 30°C, estão listados na tabela 03.

O teste ANOVA fatorial 2x3 mostrou haver interação significativa ($p > 0,1$) entre as variáveis analisadas. Indicando relação entre a concentração de carboidratos encontrada nas microalgas com a temperatura e, principalmente, com a forma de cultivo a que estavam submetidas, cultivo unialgal ou misto.

A maior concentração de carboidrato, 6,17 mg de carboidrato por g de massa seca (MS), foi registrado no cultivo unialgal de *P. boryanum* a 30°C (P30), sendo este valor significativamente maior ($P > 0,1$) que os valores encontrados para o cultivo misto (M30) e para o cultivo unialgal de *S. obliquus* (S30) na mesma temperatura, 3,86 mg/g⁻¹ de MS e 2,17 mg/g⁻¹ de MS, respectivamente.

O teste comparativo de médias mostrou haver decréscimo significativo no conteúdo de carboidrato com a diminuição da temperatura para 20°C no cultivo unialgal de *P. boryanum* (4,36 mg/g⁻¹ de MS) e acréscimo no conteúdo de carboidrato no cultivo unialgal de *S. obliquus* (3,33 mg/g⁻¹ de MS). O conteúdo de carboidratos do cultivo misto não mostrou diferença significativa quando nesta temperatura.

Tabela 03 – Conteúdo de carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis e lipídeos totais de *P. boryanum*, *S. obliquus* cultivados individualmente e em cultivo misto nas temperaturas de 30 e 20°C.

	Carboidratos (mg/g⁻¹)	% (MS)	Proteínas (mg/g⁻¹)	% (MS)	Lipídeos Totais (mg/g⁻¹)	% (MS)
P30	6,17 aA	0,62	466,6 bA	46,7	78,5 bAB	7,8
S30	2,17 bC	0,22	581,8 aA	58,2	82,5 bA	8,3
M30	3,86 aB	0,39	326,5 aB	32,6	68,7 bB	6,9
P20	4,36 bA	0,44	672,6 aA	67,3	96,3 aA	9,6
S20	3,33 aA	0,33	672,6 aA	67,3	95,5 aA	9,5
M20	3,98 aA	0,4	359,5 aB	35,9	105,3 aA	10,5

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas comparam o respectivo tratamento em ambas as temperaturas e letras maiúsculas os tratamentos dentro da mesma temperatura. ** Para carboidrato, proteínas e lipídeos $P < 0,1$. *** MS = Massa Seca.

Para as concentrações de proteínas totais solúveis a interação entre os fatores temperatura e forma de cultivo não se mostrou significativa ($p > 0,05$), ainda que o teor de proteínas tenha aumentado com a diminuição da temperatura de 30 para 20°C em todos os tratamentos, apenas para *P. boryanum* esse aumento foi considerado significativo ($p < 0,1$). Os maiores valores foram registrados nos cultivos unialgais de *P. boryanum* (P20) e *S. obliquus* (S20), 672,6 mg/g⁻¹ de MS. E os menores valores foram registrados no cultivo misto em 30 e 20°C, 326,5 e 359,5 mg/g⁻¹ de MS, respectivamente.

As maiores concentrações de lipídeos totais foram registradas para os cultivos realizados na temperatura de 20°C, não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,5$).

O menor valor foi registrado para o cultivo misto (M30) em 30°C, 68,7 mg/g⁻¹ MS, mesmo este não sendo significativamente diferente do valor encontrado no cultivo unialgal de *P. boryanum* (P30), 78,5 mg/g⁻¹ MS, na mesma temperatura.

O teste comparativo de médias, Tukey 5%, mostrou haver uma interação significativa ($p < 0,1$) entre os fatores temperatura e concentração de lipídeos totais. A diminuição da temperatura favoreceu o aumento da concentração de lipídeos produzidos em todos os tratamentos e de proteínas nos cultivos unialgais de ambas as espécies.

3.3 Clorofila “a” e carotenoides totais

Os valores registrados para as concentrações dos principais pigmentos analisados durante o experimento estão listados na Tabela 04.

Os maiores valores de clorofila ‘a’ e carotenoides totais foram registrados na segunda coleta, no final do experimento, sem diferença significativa ($p > 0,5$) entre os tratamentos realizados nas temperaturas de 20 e 30°C. O maior valor registrado foi de 3,2 µg/mL para clorofila ‘a’ no cultivo misto sob 20°C, diferindo significativamente dos resultados obtidos para os cultivos unialgais de *P. boryanum* e *S. obliquus*, 2,3 e 1,7 µg/mL, respectivamente, na mesma temperatura. Os valores de carotenoides não diferiram significativamente em nenhum tratamento realizado.

Os cultivos unialgais de *P. boryanum* e *S. obliquus* não alteraram significativamente o seu conteúdo de clorofila ‘a’ entre as duas coletas.

Tabela 04 – Conteúdo de clorofila 'a' e carotenoides totais de *P. boryanum* e *S. obliquus* cultivados individualmente e em cultivo misto, nas temperaturas de 30 e 20°C, em dois períodos do cultivo.

	Primeira Coleta (Dia10)		Segunda Coleta (Dia 21)	
	Clorofila a (µg/mL)	Carotenoides (µg/mL)	Clorofila a (µg/mL)	Carotenoides (µg/mL)
P30	1,2 bBb	0,4 aABb	3,0 aAa	1,0 aAa
S30	1,1 aBb	0,3 aBb	2,3 aBa	1,0 aAa
M30	1,8 aAb	0,6 aAb	3,1 aAa	0,9 aAa
P20	1,8 aAa	0,5 aAb	2,3 aBa	0,8 bAa
S20	1,3 aAa	0,5 aAb	1,7 aBa	0,7 aAa
M20	1,8 aAb	0,6 aAb	3,2 aAa	1,0 aAa

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas comparam o respectivo tratamento em ambas as temperaturas, letras maiúsculas os tratamentos dentro da mesma temperatura e letras minúsculas em itálico os tratamentos na mesma temperatura nos dois tempos. ** Para clorofila 'a' e carotenoides temos $P < 0,1$.

3.4 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

Teores de insaturações registradas na composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de *P. boryanum* e *S. obliquus* em seus cultivos unialgais e mistos nas diferentes temperaturas estão listados na tabela 5.

A composição dos FAMES nas microalgas variou de forma significativa no que diz respeito ao número de insaturações. Entre os tratamentos P30, S30 e M30 as concentrações dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), di-insaturados (DUFA), tri-insaturados (TUFA) e poli-insaturados (PUFA) variaram entre 17-28%, 14-30,3%, 17,6-21,6%, 18,8-33,2% e 3,1-12,2%, respectivamente.

O tratamento M30 é composto, em sua maioria, por SFA (28%), enquanto maiores valores de MUFA foram registrados nos tratamentos P30 (30,3%), P20 (33,75) e M20 (41,8%). O tratamento S30 apresenta em sua composição maiores concentrações de TUFA (33,2%), ao passo que em S20 os teores de MUFA (27,9%) e TUFA (30,5%) não foram diferentes entre si.

Tabela 05 – Teores (%) de ácidos graxos saturados (SFA), di-insaturados (DUFA), tri-insaturados (TUFA) e poli-insaturados (PUFA).

	SFA	MUFA	DUFA	TUFA	PUFA
P30	26,2 b	30,3 a	21,6 c	18,8 c	3,1 d
S30	17,2 c	14 d	23,5 b	33,2 a	12,2 d
M30	28 a	22,2 b	17,6 c	23 b	9,3 d
P20	21,1 c	33,7 a	9,1 d	30,7 b	5,5 e
S20	16 b	27,9 a	11,8 b	30,5 a	13,9 b
M20	21,7 b	41,8 a	9,8 d	20,3 c	6,4 e

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas comparam as concentrações de SFA, MUFA, DUFA, TUFA e PUFA no mesmo tratamento.

A composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos extraídos da biomassa obtida ao final do experimento para cada tratamento é mostrada na tabela 6, como a proporção do total de FAMES. Os ácidos graxos com maior representatividade em todos os tratamentos foram o ácido graxo oleico (8,2-35%), linolênico (0,9-30,7%), linolêico (8,5-22%), palmítico (12,2-22,6%) e G-linolênico (0,2-27,4%). Outros ácidos graxos foram registrados em concentrações consideradas de moderadas a baixa, como por exemplo os ácidos docosenoico (2,4-4,4%) e esteárico (1,2-4,1%).

O ácido graxo oléico foi predominante nos tratamentos P30 (22,7%), P20 (30,3%) e M20 (35,95), seguidos dos ácidos palmítico (20,9%), Gama-Linolênico (27,4%) e linolênico (19,4%), respectivamente. O ácido graxo linolênico foi registrado em maior quantidade para S30 (30,7%) e S20 (29%), seguido dos ácidos graxos linolêico (22%) e oleico (21,8%), respectivamente. Já o tratamento M30 é composto majoritariamente pelos ácidos graxos palmítico (22,6%) e linolênico (20,65).

Tabela 06 – Composição de ésteres metílicos de ácidos graxos (% do total de FAME) extraídos da biomassa de *P. boryanum* e *S. obliquus* em seus cultivos unialgais e mistos nas temperaturas de 30 e 20°C.

Ácido Graxo	30°C (%)			20°C (%)		
	P30	S30	M30	P20	S20	M20
Tetradecanóico (C14)	1,4 f	1,0 h	1,8 h	1,0 h	1,1 e	1,0 g
Pentadecanóico (C15)	0,6 f	0,5 h	0,7 i	0,3 i	0,4 e	0,4 g
Palmítico (C16)	20,9 b	14,4 c	22,6 a	15,0 c	12,2 c	15,2 c
Palmitoléico (C16:1 Δ 9)	0,6 f	0,7 h	0,8 i	0,2 i	0,6 e	0,4 g
Hexadecadienóico (C16:2 Δ 7, 10)	2,7 e	1,5 g	1,9 h	0,6 h	0,5 e	0,4 g
Hexadecatrienóico (C16:3 Δ 4, 7, 10)	0,9 f	0,4 h	0,4 i	0,6 h	0,3 e	0,3 g
Hexadecatrienóico (C16:3 Δ 7, 10, 13)	1,2 f	0,7 h	1,2 i	0,7 h	0,8 e	0,5 g
Hexadecatetraenóico (C16:4 Δ 4, 7, 10, 13)	2,6 e	9,8 d	7,4 e	4,5 e	10,6 c	4,7 e
Heptadecanóico (C17)	0,5 f	0,2 h	0,4 i	0,4 i	0,3 e	0,3 g
Heptadecenóico (C17:1 Δ 11)	0,5 f	0,4 h	0,5 i	0,3 i	0,3 e	0,3 g
Esteárico (C18)	2,4 e	1,2 h	2,0 h	1,6 g	1,9 d	4,1 e
Oléico (C18:1 Δ 9)	22,7 a	8,2 e	13,6 d	30,3 a	21,8 b	35,9 a
Eláidico (C18:1 Δ 9)	2,1 e	1,7 g	3,0 g	2,1 g	2,8 d	2,1 f
Linoléico (C18:2 Δ 9, 12)	18,8 c	22,0 b	15,7 c	8,5 d	11,4 c	9,4 d
G-Linolênico (C18:3 Δ 6, 9, 12)	15,8 d	1,4 g	0,7 i	27,4 b	0,4 e	0,2 g
Linolênico (C18:3 Δ 9, 12, 15)	0,9 f	30,7 a	20,6 b	2,0 g	29,0 a	19,4 b
Esteriadônico (C18:4 Δ 6, 9, 12, 15)	0,8 f	2,3 f	2,0 h	1,1 h	3,2 d	1,7 f
Eicosenóico (C20:1 Δ 11)	0,8 f	Nd	Nd	0,9 h	Nd	0,7 g
Docosanóico (C22:0)	0,4 f	Nd	0,4 i	2,7 f	0,04 e	0,5 g
Docosenóico (C22:1 Δ 13)	3,5 e	3,0 f	4,4 f	Nd	2,4 d	2,5 f

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas comparam os teores dos diferentes ácidos graxos na composição total de FAME no mesmo tratamento. Nd = não detectado.

A razão n-3/n-6 é apresentada na tabela 07. A interação entre a razão n-3/n-6 encontrado nos tratamentos e a temperatura foi significativa ($p < 0,1$).

Maiores valores foram registrados para S20 (3,4:1) e M20 (3,4:1), significativamente maiores que S30 (1,9:1), M30 (1,5:1), P30 (0,4:1) e P20 (0,2:1).

Tabela 07 – Razão ômega3/ômega 6 dos tratamentos cultivados em 30 e 20°C.

	$\omega-3/\omega-6$
P30	0,4:1 aB
S30	1,9:1 bA
M30	1,5:1 bA
P20	0,2:1 aB
S20	3,4:1 aA
M20	3,4:1 aA

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas comparam o respectivo tratamento em ambas as temperaturas e letras maiúsculas os tratamentos dentro da mesma temperatura.

4 DISCUSSÃO

Embora exista grande quantidade de estudos que avaliem os mesmos parâmetros aqui analisados, estes diferem dos obtidos no presente estudo quanto as metodologias empregadas, diferentes espécies utilizadas, diferenças no número de células por mililitro inoculadas e principalmente diferentes condições de luz, nutrientes, meio de cultura, pH e temperatura dos cultivos.

4.1 Crescimento e massa seca

O padrão e a dinâmica de crescimento de *P. boryanum*, quando cultivado isoladamente, foi diferente do observado para *S. obliquus* e seus co-cultivos. Os tratamentos P30 e P20 apresentaram fase lag de crescimento com duração de dois dias cada, caracterizada por aumentos imperceptíveis na densidade celular. Da mesma forma, a fase de crescimento exponencial desses tratamentos foi extremamente rápida, em comparação aos demais tratamentos, com duração de apenas 3 dias em P30 e de 6 dias para P20, com um aumento considerável na densidade celular nos meios, entrando na fase estacionária de crescimento após esse período. Fato este que não ocorreu nos demais tratamentos, os quais ainda não haviam entrado em fase estacionária de crescimento ao fim dos 21 dias do experimento.

Ainda que os tratamentos com maior taxa de crescimento e menor tempo de duplicação tenham sido P30 e P20, o rendimento máximo de ambos foi

estatisticamente menor que os de S30, S20, M30 e M20. O que pode ser explicado pelo fato de a taxa de crescimento ter sido calculada no período correspondente a fase exponencial dos cultivos e por levar em consideração a densidade celular e o tempo decorrido entre o final e o início desse intervalo (LOURENÇO, 2006). Dessa forma, o tempo de duração da fase exponencial de crescimento tem influência direta na taxa de crescimento e, conseqüentemente, no tempo de duplicação das culturas. Em adição, o crescimento das microalgas é afetado por uma série de fatores (concentração de nutrientes, intensidade luminosa, pH, fotoperíodo, características genéticas, deficiência de CO₂) que agem individualmente ou em conjunto provocando efeitos diversos nas diferentes espécies de microalgas (PHATARPEKAR *et al.*, 2000; ARKRONRAT *et al.*, 2016).

Colônias de *P. boryanum* são morfológicamente maiores que as colônias de *S. obliquus*, tendo em média 32 µm de diâmetro, em cenóbios de 16 células, e cerca de 56,9-61,5 x 60-63,8 µm, nos cenóbios de 32 células (RESTANO, 2013) enquanto que *S. obliquus* atinge cerca 9,4-13,4 x 3,4-6,7 µm (MENDES *et al.*, 2012). Sendo assim, os maiores valores de biomassa, observados em S30 e S20 ao final do experimento, estão diretamente relacionados com a maior densidade celular também encontrada nesses dois tratamentos em relação aos demais. O que é corroborado pelo fato de que mesmo em menor densidade celular a biomassa, em g/L, de *P. boryanum* em P30 foi estatisticamente igual ao cultivo misto M30 e em P20 sua biomassa foi significativamente maior que a observada em M20.

P. boryanum e *S. obliquus* quando cultivadas em conjunto, no cultivo misto, apresentaram as mesmas características observadas em seus cultivos unialgais, entretanto, uma relação de equilíbrio entre as populações foi observada a partir do 15º dia de cultivo para as duas temperaturas. Embora o número de células por mililitro das espécies tenha continuado a aumentar, a proporção entre elas se manteve igual.

Mesmo sendo espécies consideradas cosmopolitas e de fácil adaptação a diferentes condições ambientais, uma relação de dominância foi observada nos cultivos mistos onde *S. obliquus* apresentou um crescimento muito superior ao de *P. boryanum*, correspondendo a cerca de 80% da densidade total dos cultivos nos dias finais de experimento. Características como o tamanho e a complexidade das formas de reprodução afetam a taxa de crescimento e em condições de competição por

recursos, espécies menores levam vantagem pois crescem mais rápido, isso por causa da ótima razão superfície/volume que facilita a assimilação de nutrientes e a incorporação do carbono disponível do meio (PHATARPEKAR *et al.*, 2000; ARKRONRAT *et al.*, 2016).

Um padrão de crescimento diferente foi registrado por Phatarpekar *et al.* (2000) em que cultivando *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* em cultivos unialgais e mistos durante 10 dias observou menor densidade celular e taxa de crescimento nos cultivos mistos em comparação com os dois cultivos unialgais. Em relação a dinâmica de crescimento dentro da cultura mista, esses autores observaram uma alternância na relação de dominância entre as espécies do quarto para o sexto dia de cultivo. Huang *et al.* (2011) também observaram, sob altas concentrações de nitrogênio, que os cultivos mistos de *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornutum*, nas proporções de inoculação de 7:3, tiveram melhores resultados que suas respectivas monoculturas, em incremento de biomassa e densidade celular. Já Arkronrat *et al.* (2016) cultivando *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. em culturas unialgais e mistas, registrou maiores densidades celular e maiores taxas de crescimento nos tratamentos unialgal de *Nannochloropsis* sp. e misto, sem diferença significativa entre os dois.

É esperado que, abaixo da temperatura ótima, a taxa de crescimento aumente com a elevação da temperatura (JUNEJA *et al.*, 2013). O efeito da temperatura nos cultivos do presente estudo não foi uniforme, indicando haver temperaturas ótimas de crescimento diferentes para as duas espécies. De modo geral, os padrões de crescimento dos cultivos mistos foram semelhantes aos cultivos unialgais de *S. obliquus* e diferente dos observados para *P. boryanum*, apresentando melhor taxa de crescimento e tempo de duplicação em 20°C.

4.2 Carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis e lipídeos totais

Sabe-se que a temperatura exerce grande influência nas atividades metabólicas das microalgas em cultivo, no entanto, não há uma regra geral que determine o efeito das mudanças de temperatura na produção de compostos como carboidratos, proteínas e lipídeos totais, moldando a composição bioquímica desses microrganismos (RENAUD

et al., 2002; SAYEGH; MONTAGNES, 2011), podendo variar entre as espécies e tipos de cultivo a que estas estão submetidas.

É esperado que o teor proteico e de lipídeos totais aumente junto com a temperatura, até que se atinja um ponto ótimo a partir do qual as concentrações destes compostos decaem (SAYEGH; MONTAGNES, 2011; JUNEJA *et al.*, 2013). Essa tendência não foi observada no presente estudo, indicando que, provavelmente, a temperatura de 30°C está acima do ponto ótimo para as espécies *S. obliquus* e *P. boryanum*, onde as concentrações de proteínas e lipídeos começam a reduzir. Entretanto temperaturas maiores não foram analisadas.

Koru e Cirik (2003) cultivando a Cyanophyceae *Spirulina platensis*, uma microalga já utilizada como suplemento alimentar, em diferentes temperaturas, observaram um teor proteico de 58,3% da MS em cultivos realizados a 30°C. Esses mesmos autores observaram diminuição do conteúdo proteico da microalga (45,7%) estudada com o aumento da temperatura para 43°C. Rhee e Gotham (1981), ao cultivar *Scenedesmus* sp., relataram essa mesma relação da diminuição da concentração de proteínas com o aumento da temperatura. No presente estudo as concentrações de proteínas só aumentaram significativamente com a redução da temperatura de 30 para 20°C, 466,6 e 672,6 mg/g⁻¹ da MS, respectivamente, para o cultivo unialgal de *P. boryanum*.

Dickinson *et al.* (2015) registraram em seu estudo, cultivando *Scenedesmus* sp. em água residual enriquecida com 2,4x de amônio em 20°C, concentração de proteína de 400,7 mg/g⁻¹ da MS. Toyub *et al.* (2008), cultivando *S. obliquus* em meio BBM registrou valores máximos de teor de proteínas de 34,9% da MS, bem próximo do mínimo observado no presente estudo de 32,6% da MS para o cultivo misto (M30). Valores parecidos aos registrados nesta pesquisa foram observados por Um e Kim (2009), para *S. obliquus*, 50-56% da MS.

Os teores de proteínas registrados para os cultivos unialgais e mistos de *S. obliquus* e *P. boryanum*, caracterizam tais espécies como tendo uma biomassa rica em proteínas de potencial interesse para setores industriais como os da aquicultura e da alimentação animal, que estão sempre em busca de fontes econômicas, sustentáveis e funcionais de proteínas que possam ser incorporadas na formulação de rações (TIBBETTS *et al.*, 2015a). Além de rica em proteínas, para ser de interesse comercial, a biomassa utilizada precisa conter níveis elevados de grande parte dos aminoácidos

essenciais requeridos pelos animais. O estudo feito por Tibbetts *et al.* (2015a) cultivando *Scenedesmus* sp. mostrou níveis elevados de proteínas, similares aos registrados neste estudo, (entre 32-44% da MS) contendo 6, dos 10 aminoácidos essenciais encontrados em sua composição, em concentrações mais elevadas que a proteína provinda de plantas convencionais como a soja e o milho.

Os teores de proteínas totais encontrados nos cultivos realizados nesta pesquisa são similares, e muitas vezes superiores, aos descritos em literatura para plantas como a soja. No estudo de Silva *et al.* (2006) foi observado teores de 40,4% da MS no grão e 46,7% no farelo, e no estudo realizado por Sales *et al.* (2016) variações de 36,82 a 39,85% da MS, dependendo da região da planta em que o grão foi colhido. Os valores encontrados no presente estudo são maiores ainda que os encontrados em quinoa (14,1% da MS), milho (9,4% da MS) e arroz (6,8% da MS) (NOWAK; DU; CHARRONDIÈRE, 2016).

Ao contrário do que já é constatado para proteínas e lipídeos, não existe uma tendência esperada para o efeito da temperatura sobre as concentrações de carboidratos (ZHU *et al.*, 1997; SAYEGH; MONTAGNES, 2011). Células que expressam rápido crescimento são, geralmente, caracterizadas por apresentarem elevada concentração de proteínas e baixo conteúdo de carboidratos em sua composição bioquímica. O contrário é esperado, quando o crescimento é lento, em que mais carbono é direcionado para a produção de substâncias de reserva tais como carboidratos e lipídeos (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984; HENDERSON; SARGENT, 1989; ZHU *et al.*, 1997).

Os valores de carboidratos aqui observados se mostraram muito abaixo da média em relação a outros estudos já realizados com microalgas e vegetais mundialmente consumidos. Um e Kim (2009) apontam uma potencial produção de 10-17% da MS de carboidratos por *S. obliquus*. Koru e Cirik (2003), cultivando a Cyanophyceae *Spirulina platensis* em diferentes temperaturas, observaram, em 30°C, um teor de 29,7% de carboidrato por grama de massa seca e aumento significativo deste teor para 37,6%, com o aumento da temperatura para 43°C. Dickinson *et al.* (2015) registraram valores ainda maiores de carboidratos para *Scenedesmus* sp. AMDD, cultivado em águas residuais a 20°C, cerca de 581,4 mg/g⁻¹ de MS ou 58,1% da MS. Nowak, Du e Charrondièrre (2016) fizeram uma compilação de dados comparando a composição

nutricional de *Chenopodium quinoa*, a quinoa, com diversas plantas utilizadas na alimentação evidenciando seus respectivos teores de carboidratos para quinoa crua (57,4% MS), milho amarelo (67% MS), trigo branco duro (63,7%) e do arroz branco polido (79,7%). Já Silva *et al.* 2006, em seu trabalho a respeito do valor nutricional do grão e do farelo de soja (*Glycine max*) obteve valores de 17, 26% e 33,1% MS de carboidratos no grão e no farelo de soja, respectivamente. Concentrações de carboidratos semelhantes aos encontrados neste estudo foram registrados por Pastorini *et al.* (2003) em seu trabalho sobre a produção e teor de carboidratos em tubérculos de batata para as cultivares Pérola e Atlantic, durante a primavera, de 2,36 e 2,46 mg/g⁻¹.

Os baixos valores de carboidratos registrados no final da cultura podem estar relacionados ao fato de que os tratamentos foram realizados sem aspersão adicional de CO₂. Além disso, os carboidratos concorrem ativamente por precursores comuns do metabolismo central do carbono como o Gliceraldeído-3-fosfato (G3P) ou Acetil Coenzima A (Acetil-CoA) para a síntese de triacilgliceróis (TAG) e de carboidratos de reserva, sendo os lipídeos de armazenamento, principalmente TAG, reservas mais eficientes de energia em comparação com os carboidratos (ROHIT; MOHAN, 2016).

Abdelkhalek *et al.* (2016) cultivando 19 microalgas, em fotoperíodo 16/8 (dia e noite), temperaturas de 25/20°C (dia e noite) e meio Synura, coletadas de diferentes reservatórios no Marrocos, observaram que para muitas espécies o teor de lipídeos totais varia de acordo com a fase de crescimento em que o cultivo se encontra. Valores próximos ao do presente estudo foram registrados para as espécies *Selenastrum bibrainum* (4,7-7,73% da MS), *Scenedesmus quadricauda* (6,9-10,6% da MS), *Scenedesmus falcatus* (6,4-9,6% da MS), *Fragilaria* sp. (8,4-9,9% da MS), *Chlorococcum* sp. (8,7-10,4% da MS) e *Chlorella* sp. (9,8% da MS). Todas as demais microalgas produziram lipídeos em maior quantidade que os cultivos realizados neste estudo; alguns exemplos são *Ankistrodesmus falcatus* (22,29-31% da MS), *Lyngbya bergei* (24,6-52,6% da MS) e *Scenedesmus protuberans* (17,5-29,3% da MS). Os teores de lipídeos totais registrados para os cultivos unialgais de *S. obliquus*, 8,3% da MS em 30°C, se mostraram inferiores aos obtidos por Mata *et al.* (2013) de 27% da MS, cultivando a mesma espécie em meio de cultura enriquecido com água residual, na mesma temperatura.

Embora no cultivo misto tenham sido registrados as menores concentrações de carboidratos e proteínas, tais valores se mostraram praticamente inalterados com a mudança de temperatura, corroborando a ideia de que cultivos mistos são mais estáveis e por isso mais indicados para suportar as grandes variações de temperatura que podem chegar a 20°C durante um único dia, garantindo, dessa forma, uniformidade na composição bioquímica da biomassa gerada e uma produtividade constante dos cultivos realizados em ambientes externos como aqueles em lagoas abertas *outdoor* (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009; SMITH *et al.*, 2010; COPLIN, 2012).

Quando visado a produção de lipídeos totais, temperaturas mais baixas são indicadas para se cultivar *P. boryanum* e *S. obliquus*, uma vez que o presente estudo mostrou ocorrer incremento significativo na concentração deste composto a 20°C.

4.3 Clorofila “a” e carotenoides totais

Mudanças no conteúdo de pigmentos fotossintéticos são importantes indicativos dos efeitos da temperatura na atividade fotossintética das microalgas. No entanto, no presente estudo o tempo de cultivo exerceu maior influência na produção de pigmentos em relação a forma de cultivo empregada, unialgal ou misto, e a temperatura, 20 ou 30°C, com exceção apenas dos tratamentos P20 e S20 que não mostraram incremento significativo no conteúdo de clorofila ‘a’ com o aumento dos dias.

Resultados similares foram registrados por Brito *et al.* (2013), os quais avaliaram o efeito de três diferentes fontes alternativas de nutrientes no crescimento e na produção de pigmentos em um cultivo misto das espécies *Chlorella vulgaris* e *Hyaloraphidium contortum* realizado na temperatura de 20 ± 2°C. Houve aumento na concentração de clorofila ‘a’ de 0,41 para 0,66 µg/mL do dia 6 para o dia 24 de cultivo no meio alternativo 1, de 0,62 para 2,21 µg/mL e de 0,98 para 3,17 µg/mL do dia 6 ao dia 18 nos meios alternativos 2 e 3, respectivamente. As concentrações de carotenoides também aumentaram de forma significativa em relação ao tempo com valores variando de 0,19 µg/mL no dia 6 de cultura para 0,38 µg/mL no dia 24 do meio

alternativo 1 e de 0,29 e 0,39 µg/mL no dia 6 para 0,85 e 1,11 µg/mL no dia 18 de cultivo nos meios alternativos 2 e 3, respectivamente.

Chokshi *et al.* (2015) constataram concentrações muito superiores de clorofila 'a' e carotenoides totais para o cultivo de *Acutodesmus dimorphus* em relação aos obtidos nesta pesquisa para *S. obliquus*, *P. boryanum* e seus cultivos mistos. Esses autores avaliaram a concentração dos pigmentos fotossintéticos em *A. dimorphus* e obtiveram 7,23, 10,68 e 6,54 µg/mL de clorofila 'a' e 1,56, 1,96 e 1,39 µg/mL de carotenoides totais em um cultivo realizado em meio BG11, durante 15 dias, nas temperaturas de 25, 35 e 38°C, respectivamente. Também foi avaliada a concentração desses pigmentos em cultivo realizado inicialmente em 25°C com aumentos na temperatura para 35 e 38°C durante 3, 6 e 9 dias de cultivo. A mudança da temperatura durante o cultivo em 25°C não influenciou significativamente nas concentrações de carotenoides as quais variaram entre 1,23-1,45 µg/mL. Embora a concentração de clorofila 'a' tenha aumentado de acordo com os dias quando submetidas a nova temperatura, esse aumento não foi maior que os registrados nos cultivos mantidos sempre na mesma temperatura, sendo o maior valor observado 8,17 µg/mL de clorofila 'a' para o cultivo em 9 dias a 35°C.

Os pigmentos produzidos por microrganismos como fungos, bactérias e microalgas tem ganhado cada vez mais espaço no mercado industrial de corantes, na aquicultura e na suplementação animal e humana (VALDUGA *et al.*, 2009; LOURENÇO, 2006). As clorofilas são os pigmentos encontrados em maior quantidade nas microalgas, no entanto o maior interesse comercial está nos carotenoides como o β-caroteno e a astaxantina uma vez que clorofilas não possuem valor nutricional (LOURENÇO, 2006).

Sendo assim, embora o cultivo misto tenha apresentado as mesmas concentrações de carotenóides totais e as maiores concentrações de clorofila 'a', quando comparado com os tratamentos unialgais em ambas as temperaturas, esses valores não são expressivos e ficam muito abaixo do que é encontrado em microrganismos utilizados atualmente para essa finalidade no mercado, como por exemplo a microalga *Dunaliella salina* que pode produzir β-caroteno correspondente a 14% de sua massa

seca (LOURENÇO, 2006) e tem uma produtividade por dia estimada de 102,5 mg m⁻² d⁻¹ de carotenoides totais e 13,5 mg L⁻¹ d⁻¹ de β-caroteno, em condições ideais (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011).

4.4 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

4.4.1 Potencial uso como matéria prima para biodiesel

O biodiesel produzido a partir de óleos de microalgas é, provavelmente, a única fonte renovável capaz de substituir o diesel derivado do petróleo e suprir sua demanda no ramo dos transportes (CHISTI, 2007). No entanto para se tornar viável a utilização desse óleo, sua composição de ésteres metílicos precisa cumprir algumas exigências que garantem a qualidade final do biodiesel produzido.

As normativas europeias EN 14214 para biodiesel destinado ao uso nos transportes e EN 14213 do biodiesel como óleo de aquecimento, estipulam que o teor máximo de TUFA aceitável, principalmente o ácido graxo linolênico, é de 12% e 1% para PUFAs (KNOTHE *et al.*, 2006).

Desta forma, com base nestes limites estabelecidos, todos os tratamentos da presente pesquisa, os quais apresentaram valores de TUFA e PUFA acima do máximo exigido pelas normativas, não são indicados para serem utilizados como matéria prima para a produção de biodiesel, a não ser que tais valores sejam reduzidos, através da alteração das condições de cultivo. A auto oxidação dos FAMES é diretamente influenciada pelo número de insaturações, sendo assim ácidos graxos com quatro ou mais insaturações são mais sensíveis a auto oxidação e, portanto, óleos contendo elevado teor de PUFAs não podem ser armazenados por um longo período de tempo (KNOTHE *et al.*, 2006; LIRA *et al.*, 2012).

Outras propriedades físicas do biodiesel são influenciadas pela composição dos FAMES e os principais parâmetros que determinam a qualidade do óleo final são: o número de cetano (NC), que determina a qualidade da queima do biodiesel e a velocidade de ignição; o ponto de entupimento do filtro a frio (CFPP), especifica a temperatura na qual biodiesel vai entupir filtros e linhas de combustível; e a viscosidade (V), medida de resistência da vazão de um líquido (NASCIMENTO *et al.*, 2014; FRANCISCO *et al.*, 2010; KNOTHE *et al.*, 2006).

No presente estudo a presença de MUFAs como o ácido oleico e elaídico, em grandes concentrações e o baixo teor de SFAs, como o ácido palmítico e esteárico, registradas nos tratamentos, favorecem o aumento do CFPP e a diminuição da viscosidade, uma vez que ambos os parâmetros são influenciados pela concentração de ácidos graxos saturados de cadeia carbônica de comprimento médio a longo (MENEZES *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Entretanto, baixo teor de ácidos graxos saturados de cadeia longa reduzem o número de cetano (KNOTHE *et al.*, 2006).

Nascimento *et al.* (2014) avaliaram as propriedades físicas dos óleos extraídos de diversas microalgas, dentre elas, *S. obliquus* apresentou a melhor estabilidade oxidativa, índices de cetano dentro do estabelecido, porém, o CFPP foi alto, 11,6°C, o que inviabiliza seu uso como fonte de ácidos graxos para a produção de biodiesel.

4.4.2 Potencial uso na alimentação

A presença de altos teores de MUFA, fonte de energia de fácil digestão, sobretudo nos cultivos realizados em 20°C, e de PUFA, discutido aqui como o somatório de todos os ácidos graxos com duas ou mais insaturações, na fração lipídica final dos tratamentos, tornam a biomassa de *S. obliquus* e *P. boryanum* uma promissora fonte nutritiva (HUANG *et al.*, 2016; TIBBETTS *et al.*, 2015a).

A razão ômega 3/ômega 6 registrada nos tratamentos S20 e M20, são consideradas ótimas. Valores inferiores (2,45:1) foram registrados por Tibbetts *et al.* (2015a) no cultivo de *Scenedesmus* sp. e por Tibbetts *et al.* (2015b) nos cultivos de *Chlorella vulgaris* (0,31:1), *Micractinium reisseri* (0,2:1), *Nannocloris bacillaris* (0,65:1) e *Tetracystis* sp. (0,67:1). Embora a razão ômega 3/ômega 6 aqui registradas não possam competir com as registradas para óleos de peixes, as quais variam entre 3-24:1 (TIBBETTS *et al.*, 2015b), se mostraram superiores as encontradas por Martin *et al.* (2006) que compilaram dados de plantas oleaginosas comumente consumidas e suas razões ômega 3/ômega 6, para os óleos de canola (0,46), milho (0,02), oliva (0,08) e soja (0,13).

Por mais que animais sejam capazes de converter os ácidos graxos linoleico (n-6) e linolênico (n-3) em ácido araquidônico (AA, C20:4) e eicosapentaenoico (AEP, C20:5), respectivamente, sua síntese é afetada por diversos fatores (MARTIN *et al.*, 2006).

Dentre eles, a razão ômega 3/ômega 6 é fundamental, uma vez que, AA e AEP competem pelas mesmas enzimas lipoxigenases ou cicloxigenases. Em condições de baixas razão ômega 3/ômega 6, a síntese de AA é aumentada e a de AEP é reduzida acarretando desordens imunológicas, doenças cardiovasculares e inflamatórias (SIMOPOULOS, 2004).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações de temperatura influenciam o crescimento e a produção de grande parte dos biocompostos, entretanto essa influência não seguiu um padrão, sendo diferente para cada cultivo analisado.

O cultivo misto de *S. obliquus* e *P. boryanum* apresentou baixos resultados de crescimento e produção de bioquímicos de interesse comercial, quando comparados aos seus cultivos unialgais. Todavia, as comunidades mistas foram mais resistentes a alteração da temperatura, com poucas mudanças em sua composição bioquímica, sendo indicado o seu uso para cultivos em locais onde o controle desse fator não seja possível. A dominância de *S. obliquus* sobre *P. boryanum* indica não haver uso compartilhado dos recursos entre essas duas populações.

O estudo realizado da composição bioquímica da espécie *P. boryanum* em cultivo é inédito na literatura, não havendo outros registros para valores de carboidratos, proteínas e lipídeos totais, assim como a descrição do seu perfil de ácidos graxos.

O perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos dos tratamentos sob as condições de cultivo estabelecidas na presente pesquisa, não se mostrou ideal para uso na indústria como fonte de matéria prima para a produção de biocombustíveis, sobretudo de biodiesel.

No entanto, a biomassa rica em proteínas, ácidos graxos essenciais, como ácido linolênico, e com baixo teor de carboidratos, sugere um potencial uso como suplemento na alimentação humana e de animais. Principalmente a biomassa obtida no tratamento S20, que apresentou ainda elevada razão ômega3/ômega6.

Entretanto, riscos devem ser avaliados antes de indicar tais espécies para alimentação. Para isso mais estudos que analisem o perfil de aminoácidos e de

carboidratos, os teores de fibra e conseqüentemente a digestibilidade, são necessários para provar a biomassa como alimento funcional, que traz benefícios para quem a consome.

Ao contrário do que é visto nos trabalhos sobre o tema, os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciam que nem todo cultivo misto é favorável ao aumento de biomassa e produção de compostos bioquímicos. Com isso, sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de testar a interação entre as espécies quando em cultivo misto e a utilização de espécies complementares, ou seja, com diferentes pontos ótimos de temperatura, luz e assimilação de nutrientes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKHALEK, E. A. I. *et al.* Growth performance and biochemical composition of nineteen microalgae collected from different Moroccan reservoirs. **Medit. Mar. Sci.**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.321-330, 30 mar. 2016. National Documentation Centre. <http://dx.doi.org/10.12681/mms.1320>.

ARKRONRAT, W.; DEEMARK, P.; ONIAM, V. Growth performance and proximate composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. & *Tetraselmis* sp.) with monocultures. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, Tailândia, v. 1, n. 38, p.1-5, jan. 2016.

BAUMGARTNER, Tatiana Rodrigues da Silva *et al.* Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Brazilian Journal Of Biosciences**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p.250-255, abr. 2013.

BECKER, W. **Microalgae for human and animal nutrition**, In: Richmond A, Hu Q (eds), Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second ed., John Wiley and Sons, Ltd., Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, p. 461-503. 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p.911-917, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRITO, D. *et al.* Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. **The Annals Of The University Dunarea de Jos Of Galati**, Venezuela, v. 1, n. 6, p.85-97, ago. 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, v. 25, p.294-307, fev. 2007.

- CHOKSHI, K. *et al.* Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 180, p.162-171, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.102>.
- CLARENS, A. F. *et al.* Environmental Life Cycle Comparison of Algae to Other Bioenergy Feedstocks. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.1813-1819, mar. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es902838n>.
- CONVERTI, A. *et al.* Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chem. Eng. Process**, v. 48, p. 1146–1151, 2009.
- COPLIN, L. G. (Ed.). **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington: The National Academies Press, 2012.
- CUZZUOL, G. R. F.; CLIPPEL, J. K. Aspectos ecofi siológicos de *Sinningia aghensis* Chautems em condições de campo. **Hoehnea**, Vitória, v. 1, n. 36, p.73-81, jan. 2009.
- DICKINSON, K.e. *et al.* Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD grown in continuous chemostats. **J Appl Microbiol**, [s.l.], v. 118, n. 1, p.75-83, 27 nov. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12681>.
- DISMUKES, G. C. *et al.* Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 235–40, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substaces. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350 - 356, 1956.
- FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**. 3.ed. London: University of Wisconsin Press, p. 269, 1987.
- FRANCISCO, É. C. *et al.* Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 85, n. 3, p.395-403, 29 jan. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2338>.
- GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, R. W.; HAMMER, U. T. **Isolation and culture of toxic strains of Anabaena**, flos-aquae Breb. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.*, v. 19, p. 796–804, 1964.
- GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.625-644, 20 abr. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md9040625>.
- GUO, X. *et al.* Light intensity and N/P nutrient affect the accumulation of lipid and unsaturated fatty acids by *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 191, p.385-390, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.014>.
- HANNON, M. J. *et al.* Biofuels from algae: Challenges and potential. **Biofuels**, v. 1(5), p. 763-784, 2010.

HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R. Lipid composition and biosynthesis in ageing cultures of the marine cryptomonad, *Chroomonas salina*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.1355-1361, jan. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)97745-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)97745-8).

HUANG, W. *et al.* Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations. **African Journal Of Biotechnology**, Shanghai, v. 10, n. 61, p.13164-13174, 10 out. 2011.

HUANG, Y. *et al.* The Potential of Microalgae Lipids for Edible Oil Production. **Appl Biochem Biotechnol**, [s.l.], p.1-14, 4 maio 2016. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2108-6>.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.; MURTHY, G. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. **Energies**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.4607-4638, set. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en6094607>.

KHAN, S. A. *et al.* Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2361–2372, 2009.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 20, p.642-656, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.12.003>.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: Aocs Press, p. 70-83, 2006.

KORU, E.; CIRIK, S. *Spirulina platensis* (Cyanophyceae) Mikroalg'inin Büyümesine ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerine Sıcaklığın Etkisi. **Journal Of Fisheries & Aquatic Sciences**, Bornova, v. 20, n. 4, p.419-422, 2003.

LIRA, R. A. *et al.* As microalgas como alternativa á produção de biocombustíveis. **Reveng**, Viçosa, v. 20, n. 5, p.389-403, out. 2012.

LOPES, E. J. **Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr**, v. 12, p.343-346, 1967.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MARTIN, C. A. *et al.* Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 6, p.761-770, nov. 2006.

MATA, T. *et al.* Potential of microalgae *scenedesmus obliquus* grown in brewery wastewater for biodiesel production. **Chemical Engineering Transactions**, [s.l.], v. 32, p.901-906, maio 2013. AIDIC: Italian Association of Chemical Engineering. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1332151>.

MENDES, M. C. Q. *et al.* Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma

abordagem taxonômica. **Act Botanica Brasilica**, Salvador, v. 3, n. 26, p.691-696, jun. 2012.

MENEZES, R. S. *et al.* Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, Goiania, v. 36, n. 1, p.10-15, 2013.

MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. **Journal of Applied Pyrolysis**, v. 71, p.855-863, 2004.

MILLEDDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 10, n. 1, p.31-41, 2011.

NASCIMENTO, I. A. *et al.* Microalgae Versus Land Crops as Feedstock for Biodiesel: Productivity, Quality, and Standard Compliance. **Bioenergy Research**, [s.l.], p.1002-1013, 19 mar. 2014. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-014-9440-x>.

NOWAK, V.; DU, J.; CHARRONDIÈRE, U. R. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 193, p.47-54, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111>.

OHSE, S. *et al.* Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula**, Florianópolis, v. 36, p.39-74, 2007.

PASTORINI, L. H. *et al.* Produção e teor de carboidratos não estruturais em tubérculos de batata obtidos em duas épocas de plantio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 660-665, outubro/dezembro 2003.

PHATARPEKAR, P. V. *et al.* A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. **Aquaculture**, India, v. 181, p.141-155, jan. 2000.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.207-216, jan. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)80304-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)80304-0).

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p.195-214, 2002.

RESTANO, A. M. L. **Família Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae) no Estado de São Paulo: levantamento florístico**. 2013. 164 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

RHEE, G. Y.; GOTHAM, I. J. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. **Limnol. Oceanogr**, v. 26, p.635-648, 19981.

ROHIT, M. V.; MOHAN, S. V. Tropho-metabolic transition during *Chlorella* sp. cultivation on synthesis of biodiesel. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 98, p.84-91, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.041>.

- RUANGSOMBOON, S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 109, p.261-265, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.025>.
- SALES, V. H. G. *et al.* Teor de óleo e proteína em grãos de soja em diferentes posições da planta. **Revista Agro@ambiente On-line**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.22-29, 7 jun. 2016. Universidade Federal de Roraima. <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v10i1.2462>.
- SAYEGH, F. A. Q.; MONTAGNES, D. J. S. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3007-3013, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.011>.
- SILVA, M. S. *et al.* Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.571-576, set. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612006000300014>.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Rev Int**, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.
- SMITH, V. H.; STURM, B. S. M.; DE NOYELLES, F. J.; BILLINGS, S. A. The ecology of algal biodiesel production. **Trends Ecol Evol**, v. 25, p.301–309, 2010.
- SORATANA, K.; BARR, W. J.; LANDIS, A. E. Effects of co-products on the life-cycle impacts of microalgal biodiesel. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 159, p.157-166, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.070>.
- STOCKENREITER, M. *et al.* The effect of species diversity on lipid production by micro-algal communities. **Journal Of Applied Phycology**, v. 24, p.45-54, 2012.
- STRIKLAND, J. D. H; PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis. **Bull. Fish. Res. Bd Can.**, 167: p.1-311, 1968.
- TIBBETTS, S. M. *et al.* Nutritional Evaluation of Whole and Lipid-Extracted Biomass of the Microalga *Scenedesmus* sp. AMDD Isolated in Saskatchewan, Canada for Animal Feeds: Proximate, Amino Acid, Fatty Acid, Carotenoid and Elemental Composition. **Current Biotechnology**, Canadá, v. 4, p.530-546, 2015.
- TIBBETTS, S. M. *et al.* Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. **Algal Research**, [s.l.], v. 11, p.435-447, set. 2015b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.011>.
- TOYUB, M. A. *et al.* Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. **Bang. J. Anim. Sci.**, Bangladesh, v. 37, n. 1, p.86-93, 2008.
- UM, B. H.; KIM, Y. S. A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 1-7, 2009.
- VALDUGA, E. *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, Florianópolis, v. 32, n. 9, p.2429-2436, 2009.
- XIN, Li; HONG-YING, Hu; YU-PING, Zhang. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation

temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3098-3102, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K.; CHAO, T. M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 451-457, 1997.