

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**EFEITO DE FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E NA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS *Chaetoceros muelleri*
E *Thalassiosira fluviatilis*, COM ÊNFASE NO TEOR DE ÁCIDOS
GRAXOS POLIINSATURADOS.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias
da Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito final para a obtenção do título de Doutor em
Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. **Roseane Fett**, Dra

ROBERTO BIANCHINI DERNER

FLORIANÓPOLIS

2006

TERMO DE APROVAÇÃO

EFEITO DE FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, COM ÊNFASE NO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.

Autor: **Roberto Bianchini Derner**, M.Sc.

Orientadora: Prof^a. **Roseane Fett**, Dra.

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos no Curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, CAL, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada por:

Presidente: Prof^a. **Roseane Fett**, Dra.

Membro: Prof. **Luis Antônio de Oliveira Proença**, Dr.

Membro: Prof. **Edemar Roberto Andreatta**, Dr.

Membro: Prof. **Ernani Sant'Anna**, Dr.

Membro: Prof^a. **Silvana Ohse**, Dra.

Coordenadora: Prof^a. **Marilde T. Bordignon Luiz**, Dra.

Florianópolis, 02 de fevereiro de 2006.

DERNER, Roberto Bianchini

EFEITO DE FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, COM ÊNFASE NO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS. Roberto Bianchini Derner. Florianópolis, 2006.

xviii, 140 p.; il.

Orientadora: Roseane Fett.

Tese/Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006.

Bibliografia

1. palavras-chave: microalgas, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis*, composição bioquímica, ácidos graxos poliinsaturados, EPA e DHA.

À TEREZINHA, RAFAEL, LUISA e RENATA,
MÃE, FILHO, FILHA e MULHER.

À MEMÓRIA de MEU PAI.

AGRADECIMENTOS

A Deus, G.: A.: D.: U.: ou Oxalá.

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, ao Centro de Ciências Agrárias – CCA e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CAL, pela possibilidade de realização do Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos.

À Prof^a. Roseane Fett, Dra. do CAL / CCA / UFSC, pela orientação nesta Tese, por sua compreensão e apoio.

À memória do Prof. José Antônio Simões Hammad, Dr., que partiu prematuramente para o Oriente Eterno, pela orientação na fase inicial do trabalho de Tese.

Ao Prof. Luis Antônio de Oliveira Proença, Dr., do CTTMar da UNIVALI, por ser o relator da Tese e pelas valiosas sugestões.

A todos os membros da Banca Examinadora pelas essenciais sugestões para o aperfeiçoamento da Tese.

Ao Prof. Edeamar Roberto Andreatta, Dr., Chefe do Departamento de Aqüicultura da UFSC, pela amizade e pelo permanente apoio no desenvolvimento deste trabalho de Tese.

Ao Prof. Elpídio Beltrame, Dr., Coordenador do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, pela amizade e pelo apoio moral, econômico e logístico para a elaboração desta Tese.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos pelos valiosos ensinamentos durante a realização do Curso.

A PETROBRAS, em especial a Paulo Cunha, Cláudia Pavan Lamarca e Márcia Estevão, pela disponibilização da infra-estrutura instalada no Laboratório de Biotecnologia Alimentar - BIOTEC / CAL / CCA / UFSC pertencente ao Projeto “Seqüestro de carbono com utilização de microalgas em água doce e em ambientes

marinhos” – PETROBRAS / UFSC / FAPEU, para o desenvolvimento dos cultivos experimentais.

À equipe do referido Projeto na UFSC e, especialmente ao Coordenador Prof. Jorge Luiz Barcelos Oliveira, Dr., à Pesquisadora Silvana Ohse, Dra., à Eng. de Aqüicultura Renata Ávila Ozório (mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos), a Maurício Villela (graduando do Curso de Engenharia de Aqüicultura), a Gabriel Junqueira Cabral (graduando em Engenharia de Alimentos) e aos colaboradores Fabrício Gonçalves e Rafaela Gordo (graduandos do Curso de Engenharia de Aqüicultura) e à Farmacêutica Sabrina Matos de Carvalho (mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos), pela permanente e competente ajuda no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

Ao Prof. Ernani Sebastião Sant’Anna Dr., Coordenador do BIOTEC da UFSC, pela possibilidade do desenvolvimento dos cultivos e das análises neste Laboratório e por seu permanente apoio.

Ao Dr. Humberto Villareal Colmenares, Coordenador do Projeto II.8.- “Optimización de alimentos y estrategias de alimentación para una camaronicultura sustentable” do Programa CYTED – Cooperación Iberoamericana, Subprojeto II – Acuicultura, pelo apoio logístico durante a estadia para o desenvolvimento de parte das análises laboratoriais no Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste - CIBNOR, México.

Aos companheiros Dr. Guillermo Portillo Clark e Dr. Francisco Magallón do CIBNOR, pela amizade, pelos momentos em busca da paz e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Pesquisadora Laura Careón Palau, M.Sc., do CIBNOR, pelo auxílio no processo de análise dos lipídios e ácidos graxos.

A coordenadora do Curso de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos Prof^a. Marilde T. Bordignon Luiz, Dra. e ao Secretário do Curso Sérgio de Souza pela assistência e presteza.

Aos colegas Marlene Alano Coelho de Aguillar M.Sc., Rodrigo Schweitzer M.Sc., Daniela Soares Maggione M.Sc., Biólogo Frank Belettini, Prof. Luis Vinatea Arana Dr., Prof. Walter Quadros Seiffert Dr., João Santana, Lamartine Richard Junior M.Sc., José Luis Mourino, M.Sc., Anselmo Teixeira de Souza e Augusto Dornelles Carvalho, bem como a todos os demais colaboradores do LCM da UFSC, pelo constante incentivo e apoio na continuidade do processo produtivo no Laboratório.

Aos colegas Rui Raulino Coelho, Roberto Edevaldo Coelho, Tiago Tomaz Ramos e Adilton Valdori Sagaz, colaboradores do Setor de Microalgas do LCM da UFSC, por “segurarem a barra” nos diversos momentos em que estive ausente do Laboratório desenvolvendo o trabalho de Tese. Aos bolsistas e ex-bolsistas do referido Setor pela constante dedicação na execução das tarefas do Laboratório.

Aos meus Irmãos de sangue, Irmãos de fé, Irmãos fraternos, Pais, Mães e demais Parentes que me acolheram e incentivaram, possibilitando a concretização deste meu objetivo.

À minha Mãe Terezinha Bianchini Derner M.Sc., por seu afeto e incondicional apoio.

Aos meus Filhos Rafael Pacheco Derner e Luisa Pacheco Derner pelo seu imenso amor e, especificamente, pela sua compreensão nos inúmeros momentos em que estiveram privados da minha presença no desenvolvimento de suas vidas.

À minha Mulher Renata Ávila Ozório, por seu incondicional apoio, imensa paciência e principalmente seu grande amor, imprescindíveis para uma convivência harmoniosa nesta situação estressante.

A todas as pessoas que não estão aqui citadas mas que por algum motivo me fizeram acreditar que seria possível vencer mais esta demanda.

" Quando Ogum foi para a guerra,

Ele mandou orar, orar,

Quando Ogum venceu a guerra,

Ele mandou orar, orar,

Orar, orar ... orar, orar

é vencer! "

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	ALGUMAS CARATERÍSTICAS DAS MICROALGAS	4
3.2	ASPECTOS DO CRESCIMENTO MICROALGAL	7
3.2.1	Avaliação do Crescimento Microalgal	11
3.2.1.1	Curva de Crescimento	11
3.2.1.2	Parâmetros de Crescimento	13
3.2.2	A Importância do Carbono	14
3.3	PRODUÇÃO DE COMPOSTO DE INTERESSE	19
3.3.1	Os Ácidos Graxos Poliinsaturados	23
3.4	A PRODUÇÃO COMERCIAL	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	30
4.1.1	<i>Chaetoceros muelleri</i> , Lemmerman, 1898	30
4.1.2	<i>Thalassiosira fluviatilis</i> , Husted, 1926	31
4.2	MEIO DE CULTURA	32
4.3	ACLIMATAÇÃO PRÉVIA	33
4.4	CONDIÇÕES DE CULTIVO	34
4.5	FONTES DE CARBONO	35
4.6	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	35
4.6.1	Curvas de Crescimento	36
4.6.2	Densidade Celular Máxima (DCM)	36
4.6.3	Tempo de Cultivo (TEMPO)	36
4.6.4	Velocidade de Crescimento (k)	37
4.7	ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS	37
4.7.1	Obtenção da Biomassa Liofilizada	38

4.7.2	Biomassa Seca	38
4.7.3	Proteínas Hidrossolúveis	39
4.7.4	Carboidratos Totais	39
4.7.5	Lipídios Totais	40
4.7.6	Ácidos Graxos	41
4.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.8.1	Análise Estatística	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	46
5.1.1	Curvas de Crescimento	46
5.1.2	Valores do pH	49
5.1.3	Densidade Celular Máxima (DCM)	51
5.1.4	Tempo de Cultivo (TEMPO)	55
5.1.5	Velocidade de Crescimento (k)	57
5.2	ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS	59
5.2.1	Biomassa Seca	59
5.2.2	Proteínas Hidrossolúveis	65
5.2.3	Carboidratos Totais	70
5.2.4	Lipídios Totais	76
5.2.5	Ácidos Graxos	82
5.2.5.1	Ácidos graxos poliinsaturados	87
5.2.5.2	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	88
5.2.5.3	Ácido docosahexaenóico (DHA)	96
6.	CONCLUSÕES	105
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
8.	ANEXOS	122
8.1	ANEXO 1 – TABELAS DE DADOS	122
8.2	ANEXO 2 - ANOVA DOS DEMAIS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	126

LISTA DE TABELAS

1	Alguns produtos obtidos de microalgas	21
2	Fontes de ácidos graxos poliinsaturados e microrganismos produtores	26
3	Empresas, localização, microalgas cultivadas, seus produtos e a atividade biológica atribuída	28
4	Composição do Meio F/2 modificado de GUILLARD (1975), empregado nas culturas microalgais	33
5	Modelo do desenho experimental aplicado no estudo comparativo do crescimento e da composição bioquímica das microalgas <i>Chaetoceros muelleri</i> (CMU) e <i>Thalassiosira fluviatilis</i> (TFL)	43
6	Análise de variância unifatorial para a densidade celular máxima para <i>C. muelleri</i>	52
7	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a densidade celular máxima (DCM) para <i>C. muelleri</i>	53
8	Análise de variância unifatorial para a densidade celular máxima para <i>T. fluviatilis</i>	54
9	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a densidade celular máxima (DCM) para <i>T. fluviatilis</i>	54
10	Análise de variância unifatorial para o tempo de cultivo (TEMPO) para <i>C. muelleri</i>	56
11	Análise de variância unifatorial para o tempo de cultivo (TEMPO) para <i>T. fluviatilis</i>	56
12	Análise de variância unifatorial para a velocidade de crescimento para <i>C. muelleri</i>	58
13	Análise de variância unifatorial para a velocidade de crescimento para <i>T. fluviatilis</i>	58
14	Análise de variância fatorial para a biomassa seca	60
15	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para biomassa seca as espécies	61
16	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para biomassa seca entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	61
17	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para biomassa seca entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies	62
18	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para biomassa seca da interação entre espécie e fonte de carbono	63

19	Análise de variância fatorial para proteínas hidrossolúveis	66
20	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) entre as espécies	67
21	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) entre as fontes de carbono	67
22	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	68
23	Teste de comparação de médias (Tukey com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono	69
24	Análise de variância fatorial para carboidratos totais	71
25	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) entre as espécies	71
26	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies	72
27	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	73
28	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono	73
29	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre fase da curva de crescimento e fonte de carbono	74
30	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie, fase da curva de crescimento e fonte de carbono	75
31	Análise de variância fatorial para lipídios totais	77
32	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) entre as espécies, considerando ambas as espécies	78
33	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	78
34	Teste de comparação de médias (Tukey com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) entre fonte de carbono	79
35	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	80

36	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono	80
37	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre fases da curva de crescimento e fonte de carbono	81
38	Valores médios da concentração de ácidos graxos da biomassa seca e percentual relativo do total de ácidos graxos, para <i>C. muelleri</i> em cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono	84
39	Valores médios da concentração de ácidos graxos da biomassa seca e percentual relativo do total de ácidos graxos, para <i>T. fluviatilis</i> em cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono	85
40	Análise de variância fatorial para o conteúdo de EPA na biomassa seca	90
41	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies	90
42	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	91
43	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre fonte de carbono	91
44	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento	92
45	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono	93
46	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase da curva de crescimento e fonte de carbono	94
47	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie, fase da curva de crescimento e fonte de carbono	95
48	Análise de variância fatorial para o conteúdo de DHA na biomassa seca ...	97
49	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies	97
50	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies	98
51	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies	99

52	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento	99
53	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono ..	100
54	Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie, fase da curva de crescimento e fonte de carbono	101
55	Composição bioquímica (em percentual da biomassa seca) de microalgas dos gêneros <i>Chaetoceros</i> e <i>Thalassiosira</i>	102

LISTA DE FIGURAS

1	Curva de crescimento de uma cultura microalgal num cultivo do tipo estacionário	11
2	Microfotografia da microalga <i>Chaetoceros muelleri</i>	31
3	Microfotografia da microalga <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	31
4	Frascos de cultura de <i>C. muelleri</i> e <i>T. fluviatilis</i> empregados nos experimentos	34
5	Curvas de crescimento de <i>C. muelleri</i> (CMU) para cada fonte de carbono. Cada curva representa a média de três repetições, em número de células por mililitro. As setas indicam os pontos de amostragem para as análises bioquímicas (fases exponencial e estacionária)	47
6	Curvas de crescimento de <i>T. fluviatilis</i> (TFL) para cada fonte de carbono. Cada curva representa a média de três repetições, em número de células por mililitro. As setas indicam os pontos de amostragem para as análises bioquímicas (fases exponencial e estacionária)	48
7	Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas de <i>C. muelleri</i>	49
8	Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas de <i>T. fluviatilis</i>	49
9	Densidade celular máxima (DCM) para cada espécie e para cada para cada fonte de carbono. CMU = <i>Chaetoceros muelleri</i> , TFL = <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	51
10	Tempo de cultivo em dias (TEMPO) para cada espécie e para cada fonte de carbono	55
11	Velocidade de crescimento em divisões por dia (k) para cada espécie e para cada fonte de carbono	57
12	Biomassa seca em miligramas por litro considerando cada espécie, cada fase da curva de crescimento e cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária)	60
13	Proteínas hidrossolúveis em miligramas por grama da biomassa seca, considerando cada espécie, cada fase da curva de crescimento e cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária)	65
14	Carboidratos totais em miligramas por grama da biomassa seca, considerando cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária)	70
15	Lipídios totais em miligramas por grama da biomassa seca, considerando cada espécie, cada fase da curva de crescimento e cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária)	76
16	Percentual do total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados encontrados na biomassa microalgal seca	86

17	Percentual individual relativo do total de ácidos graxos poliinsaturados obtidos na biomassa seca de <i>C. muelleri</i> e <i>T. fluviatilis</i>	87
18	Valores médios do conteúdo de EPA em microgramas por miligrama da biomassa seca, considerando cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária)	89
19	Valores médios do conteúdo de DHA em microgramas por miligrama da biomassa seca, considerando cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária)	96

Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados.

RESUMO

Para investigar o efeito de distintas fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica de microalgas *Chaetoceros muelleri* Lemmerman e *Thalassiosira fluviatilis* Husted (diatomáceas marinhas), foram desenvolvidos cultivos experimentais com estas espécies. Os fatores avaliados foram a resposta das microalgas, nas fases exponencial e estacionária da curva de crescimento, quando cultivadas com ar atmosférico (controle – cultivo fotoautotrófico) ou com fontes suplementares de carbono (glicose, acetato – cultivo mixotrófico ou com CO₂). Os parâmetros de crescimento analisados foram a densidade celular máxima alcançada, o tempo de cultivo e a velocidade de crescimento. Quanto à composição bioquímica, foi analisada a produtividade volumétrica das culturas e, na biomassa obtida dos diferentes tratamentos, foi determinado o conteúdo de proteínas hidrossolúveis, carboidratos totais, lipídios totais e ácidos graxos poliinsaturados, em especial o conteúdo do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexaenóico (DHA). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância fatorial (ANOVA com $p < 0,05$) e quando necessário ao Teste de Comparação de Médias de Tukey ($p < 0,05$). Quanto à densidade celular máxima, a microalga *C. muelleri* apresentou o maior valor quando cultivada com o emprego de CO₂, enquanto as demais fontes suplementares de carbono não mostraram diferenças em relação ao controle. A espécie *T. fluviatilis* não apresentou diferença entre as fontes de carbono em relação à densidade celular máxima. Quanto ao tempo de cultivo e à velocidade de crescimento, ambas as espécies não apresentaram diferenças entre os fontes de carbono. A microalga *C. muelleri* apresentou maior biomassa seca e maior conteúdo de carboidratos enquanto que *T. fluviatilis* apresentou maior conteúdo de proteínas hidrossolúveis, de lipídios, de EPA e de DHA. A biomassa seca, o conteúdo de lipídios, de EPA e de DHA foram maiores na fase estacionária da curva de crescimento para ambas as espécies. O conteúdo de proteínas hidrossolúveis foi maior na biomassa de *C. muelleri* na fase exponencial e na fase estacionária de *T. fluviatilis*. O emprego do CO₂ resultou numa maior biomassa, num maior conteúdo de proteínas hidrossolúveis e de lipídios para ambas as espécies. O emprego do acetato resultou numa menor concentração de carboidratos. O conteúdo de EPA foi superior com o emprego de todas as fontes suplementares de carbono e a concentração de DHA foi maior nas culturas com acetato e CO₂.

Palavras chave: microalgas, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis*, composição bioquímica, ácidos graxos poliinsaturados, EPA, DHA.

Effect of carbon sources on the growth and biochemical composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* and *Thalassiosira fluviatilis*, with emphasis in the polyunsaturated fatty acids content.

ABSTRACT

To investigate the effect of different carbon sources on growth and biochemical composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* Lemmerman and *Thalassiosira fluviatilis* Husted (marine diatoms), were developed experimental cultures of these species. The factors assessed were the response of the species, in the exponential and stationary phases of the growth curve, when cultured with atmospheric air (control – photoautotrophic) or with carbon supplementation (glucose, acetate – mixotrophic culture, or CO₂). The growth parameters that were evaluated are maximum cellular density, time of culture and growth rate. As for the biochemical composition, were analyzed the volumetric productivity (dry weight) of the cultures and determined the concentrations of water soluble proteins, total carbohydrates, total lipids and polyunsaturated fatty acids, specially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosaexaenoic acid (DHA). Data were submitted to factorial analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$) and when necessary to Tukey's Means Comparison Test ($p < 0.05$). The microalgae *C. muelleri* presented the highest maximum growth when cultured with CO₂, whereas the other carbon supplements were not different from the control. *T. fluviatilis* did not present differences among carbon sources as regards maximum cellular density. As for time of culture and growth rate neither of the species showed differences among carbon sources. *C. muelleri* presented higher biomass and higher carbohydrate content, whereas *T. fluviatilis* presented higher water soluble proteins, lipids, EPA and DHA concentrations. Dry biomass, lipids content, EPA and DHA were higher for both species in the stationary phase of the growth curve. Water soluble protein content was higher in *C. muelleri* biomass during the exponential phase, and during the stationary phase in *T. fluviatilis* biomass. CO₂ supplementation resulted in higher biomass, water soluble protein and lipids contents for both species. Acetate resulted in lower carbohydrate concentration. EPA content was higher with all supplementary carbon sources tested, whereas DHA concentration was higher in the cultures with acetate and CO₂ supplementations.

Keywords: microalgae, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis*, biochemical composition, polyunsaturated fatty acids, EPA, DHA.

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse no estudo de microrganismos como microalgas, alguns fungos (leveduras por exemplo) e bactérias, deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentar, química e farmacêutica dentre outras (BOROWITZKA, 1993; CERTIK; SHIMIZU, 1999; KIRK; BEHRENS, 1999; LEMAN, 1997; BRUNO, 2001; GROBBELLAR, 2004a; RICHMOND, 2004a).

Atualmente as pesquisas em biotecnologia alimentar empregando microalgas vêm ganhando especial atenção, no entanto, a coleta e o cultivo para utilização na alimentação humana são realizados há séculos (RICHMOND, 1988). Segundo o mesmo autor, povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco (Astecas), no México, alimentavam-se de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* spp. e, ainda hoje, os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, dependem quase que exclusivamente da coleta da biomassa desta microalga para sua alimentação (JOURDAN, 1996).

A imensa biodiversidade, e conseqüente variabilidade na composição bioquímica destes microrganismos, aliada ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala vêm permitindo que as microalgas sejam utilizadas em diversas aplicações. Neste sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos bioativos e medicinais com alto valor no mercado mundial, os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (BOROWITZKA, 1999, MOLINA GRIMA et al., 2003).

Determinadas espécies de microalgas são cultivadas comercialmente em alguns países e, a biomassa produzida, tem sido utilizada como matéria-prima e como fonte de produtos (extraídos) para aplicação na indústria de alimentos. Conforme Pulz e Gross (2004), o mercado de alimentos funcionais utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas apresenta rápido desenvolvimento

em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são *Chlorella* spp. e *Arthrospira* spp. para a adição em alimentos naturais (health food), *Dunaliella salina* para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* para a obtenção de astaxantina (BECKER, 2004).

Dentre inúmeros compostos, a obtenção de ácidos graxos poliinsaturados a partir de culturas de microalgas representa uma fonte alternativa de produção desta classe de lipídios, bem como, também proporciona uma série de vantagens quando comparada com fontes convencionais de obtenção destas substâncias (ROBLES MEDINA et al., 1998).

São diversos os estudos encontrados na literatura visando ao estabelecimento do efeito das condições ambientais (de cultivo) sobre o crescimento e a composição bioquímica das microalgas, entretanto, existem poucos trabalhos desenvolvidos com diatomáceas e, nenhuma referência foi encontrada em relação às espécies de microalgas nas condições de cultivo (fontes carbono) empregadas no presente Trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o crescimento das culturas e a composição bioquímica da biomassa de *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, quando cultivadas com diferentes fontes de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os parâmetros de crescimento em termos da densidade celular máxima alcançada, do tempo de cultivo e da velocidade de crescimento das culturas, desenvolvidas com a adição de distintas fontes de carbono (dióxido de carbono, glicose ou acetato de sódio);

Determinar, nas fases exponencial e estacionária da curva de crescimento, a produtividade das culturas (biomassa seca) e o conteúdo de proteínas hidrossolúveis, carboidratos totais e lipídios totais;

Qualificar e quantificar na fração lipídica os ácidos graxos poliinsaturados, particularmente os ácidos eicosapentaenóico e docosaheptaenóico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS

O termo **microalgas** não tem valor taxonômico, engloba **microrganismos algais** com **clorofila a** e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a **fotossíntese oxigênica** e, sua caracterização (sistemática) implica na consideração de uma série de critérios (HOEK; MANN; JAHNS, 1995, RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Conforme Tomaselli (2004), as microalgas têm sido tradicionalmente classificadas por diversos critérios como os tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também, têm sido considerados outros aspectos como critérios citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear.

Além dos critérios anteriormente relacionados, técnicas de biologia molecular atualmente têm sido usadas para a classificação das microalgas (HU, 2004).

Sob a denominação **microalgas** estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular:

- **microalgas que apresentam estrutura celular procariótica:** com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta;

- **microalgas que apresentam estrutura celular eucariótica:** com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta (Haptophyta, segundo Teixeira, 2002), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta segundo a classificação de Hoek, Mann e Jahns (1995).

Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, estes são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas (ABALDE et al., 1995).

As microalgas são principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo e são consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004).

Conforme Arredondo-Vega (1995), as microalgas (produtores primários) armazenam energia solar, convertendo-a em energia biológica, sendo a biomassa microalgal a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos. Os constituintes deste nível trófico sintetizam nova matéria orgânica a partir de substratos inorgânicos como sais (nutrientes), CO₂ e água e, esta energia biológica é utilizada em sua maior parte como alimento pelos organismos que constituem o segundo nível trófico (consumidores primários), dando continuidade às cadeias alimentares aquáticas.

Nos ambientes aquáticos, as microalgas são, ao menos em parte do ciclo de vida, o alimento principal de animais fitófagos como algumas espécies de peixes, de moluscos (filtradores) e de crustáceos, por exemplo. Além disso, todos os organismos vivos (aquáticos e terrestres) dependem direta ou indiretamente do oxigênio oriundo da fotossíntese realizada pelas microalgas para sua respiração (SHELEF; SOEDER, 1980).

Segundo Borowitzka (1999), as microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de cultivo, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Em geral, os sistemas de produção são pouco sofisticados, uma vez que, muitas empresas desenvolvem cultivos a céu aberto em tanques com fundo de terra e com baixo ou nenhum controle dos parâmetros ambientais. Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamentos específicos, denominados fotobioreatores, nos quais é possível controlar os parâmetros ambientais e, isto implica numa elevada produtividade, a qual viabiliza a produção comercial de compostos de elevado valor (TREDICI, 2004).

Muitas das substâncias sintetizadas e acumuladas pelas microalgas são também encontradas nas plantas, as quais evoluíram das algas verdes ou Chlorophyceae (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Entretanto, conforme Cohen (1986) e Richmond (1990a), a produção microalgal pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas:

- um cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que, muitas espécies crescem mais rapidamente que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos de biomassa (maior produtividade);

- sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre nas plantas terrestres, que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes;

- por manipulação das condições ambientais de cultivo (e. g. luz, temperatura, nutrientes) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios etc. Tais compostos apresentam um elevado valor comercial, principalmente por serem produtos naturais;

- podem crescer bem em regiões com extremas condições climáticas. Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos processos de produção (agropecuária, industrial e dejetos domésticos, por exemplo);

- o ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies.

O número exato de espécies microalgais ainda é desconhecido, atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos como ácidos graxos poliinsaturados, corantes, enzimas etc. (NORTON; MELKONIAN; ANDERSEN, 1996; PULZ; GROSS, 2004).

Nos oceanos, as Classes Bacillariophyceae (diatomáceas) e Dinophyceae (dinoflagelados) são as formas vegetais (*sic*) mais abundantes e representativas, tanto em número de indivíduos, quanto em espécies (BONECKER; BONECKER; BASSANI, 2002). Segundo os mesmos autores, as diatomáceas ocorrem em todos os ambientes aquáticos: marinho, salobro, ducícola e hipersalino e, são encontradas em águas tropicais, temperadas e polares, podendo ser planctônicas ou bentônicas. Na maior parte do tempo, as células desta Classe se reproduzem por fissão binária, entretanto podem também se reproduzir de maneira sexuada (ou gamética), sendo

oogâmica nas diatomáceas cêntricas e anisogâmica nas penadas, além de, poderem também, formar esporos de resistência.

As diatomáceas se diferenciam da maioria das demais microalgas por sua parede celular constituída de sílica. Conforme Scala e Bowler (2001), são responsáveis por 40 % da produção primária marinha. O número de gêneros e espécies é de aproximadamente 250 e 100.000, respectivamente (NORTON; MELKONIAN; ANDERSEN, 1996; HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Apesar da abundância e diversidade, poucas espécies de diatomáceas têm sido empregadas em aquicultura ou para a produção biotecnológica de produtos de interesse comercial (LEBEAU; ROBERT, 2003).

De acordo com Spinks (1980) citado por Vilchez (1997), a biotecnologia tem sido definida como a utilização de organismos vivos, sistemas biológicos ou processos para o benefício público e, o uso de microalgas é capital na biotecnologia, uma vez que, estas apresentam um metabolismo muito ativo e podem crescer sob condições simples e de baixo custo. Segundo o mesmo autor, o futuro do processo produtivo por meio do uso de microrganismos e de tecnologia genética (transgênese, engenharia metabólica etc.) é praticamente ilimitado.

3.2 ASPECTOS DO CRESCIMENTO MICROALGAL

As respostas aos estímulos ou a mudanças ambientais são inerentes a todos os organismos vivos. Especificamente nas microalgas, a resposta das células às condições ambientais define os fatores como **limitante** – redução da taxa de crescimento e/ou de alguma reação bioquímica sem a necessidade de aclimatação celular; ou **estressante** – implica num desequilíbrio metabólico, o qual demanda ajustes bioquímicos antes que as células possam estabelecer um novo estado de crescimento ou biossíntese (VONSHAK; TORZILLO, 2004).

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Quanto aos fatores físico-químicos, que

afetam o crescimento das microalgas, são principalmente reportados estudos sobre a luz, a temperatura, a salinidade e a disponibilidade de nutrientes (HELLENBUST, 1970; GUILLARD, 1975; EPPLEY, 1977; YONGMANITCHAI; WARD, 1991, LOURENÇO; MARQUES JUNIOR, 2002).

Segundo Gladue (1991), a maioria das espécies algais é fotoautotrófica, isto é, através da fotossíntese obtém energia da luz para fixar carbono, necessário para a construção de biomassa. Sendo assim, a relação entre a síntese de material orgânico como reflexo da produção fotossintética pode ser expressa principalmente pelo incremento da população algal (BALECH, 1977).

A condição de luz, a qual deve ser considerada em termos de fotoperíodo (tempo de exposição à luz, ou fotofase), intensidade e qualidade (comprimento de onda), é de fundamental importância para as algas (DUBINSKY, 1990; SÁNCHEZ-SAAVEDRA; VOLTOLINA, 1994). O fato de que a luz varia tanto no espaço (profundidade e latitude) quanto no tempo (diariamente e sazonalmente), implica ser este um fator condicionador do crescimento fitoplanctônico (DARLEY, 1982).

De toda a radiação eletromagnética que incide sobre os organismos fotossintetizantes somente o espectro visível, isto é, com comprimento de onda entre 400 e 720 nm (radiação fotossinteticamente ativa – “PAR”), pode ser absorvido pelos pigmentos fotossintéticos e usado para a fotossíntese (LIPÍDIOS; AVISSAR, 1990). Os pigmentos fotossintetizantes microalgais podem ser classificados em três grupos: as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas, sendo que, cada um difere em sua composição química e apresenta diferente capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda (ROUND, 1983).

Conforme Masojídek, Koblízek e Torzillo (2004), aproximadamente 40% da energia solar que incide sobre a superfície terrestre (num dia ensolarado) constitui a “PAR”, representando cerca de 400 W/m^2 ou $1.800 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. Uma vez captada pelos pigmentos fotossintéticos, a energia luminosa é transferida para os centros de reação onde será utilizada para as reações fotoquímicas.

Em cultivos fotoautotróficos, a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético irá repercutir na quantidade de carbono que pode ser fixado,

determinando conseqüentemente a produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas microalgais (TZOVENIS; DE PAUW; SORGELOOS, 2003).

Quanto ao fotoperíodo, os trabalhos de Derner et al. (1994) e Derner (1995), sobre o crescimento de *Chaetoceros calcitrans* e *Thalassiosira fluviatilis*, apontam que a utilização do fotoperíodo integral acarretou maior crescimento destas espécies quando comparado ao emprego de fotoperíodo parcial. Diferentemente, Toro (1989) reporta que culturas de *Chaetoceros gracilis* cresceram de maneira similar em regimes de luz (Light:Darkness – L:D) de 24:0 e 12:12. Todavia, Foy e Gibson (1993), reportam que em culturas de três espécies de diatomáceas o crescimento foi favorecido com o emprego de fotoperíodo integral (24:0). Apesar dos resultados apresentados e de inúmeros outros reportando a vantagem - em relação ao crescimento da população microalgal - do uso de iluminação das culturas em tempo integral, existe igual número de trabalhos discordando destes dados.

Estudos demonstram que a taxa fotossintética apresenta um incremento proporcional à intensidade luminosa e se nivela em altas intensidades, chegando a um nível de saturação ou de máxima produção. Este valor (intensidade luminosa) ao ser ultrapassado, pode causar uma redução da atividade fotossintética devido ao efeito da inibição na produção de pigmentos, da fotoxidação destes pigmentos e também das enzimas envolvidas no processo fotossintético (BONEY, 1989).

Segundo Peterson et al. (1987), inúmeras formulações matemáticas empíricas, desde as mais simples até equações com uma multiplicidade de fatores, são usadas para descrever a fotossíntese como uma função da intensidade, da qualidade da luz e do fotoperíodo.

Além da influência do fotoperíodo e da intensidade, o crescimento de uma população algal também responde diferentemente quanto ao tipo de luz. Conforme Abe e Galvão (1991), a diatomácea *Cyclotella caspia* apresentou maior crescimento quando iluminada com luz azul, e que, quando submetida à luz vermelha respondeu com um aumento na concentração de clorofila *a*. Também Rivkin (1989), aponta que a qualidade do espectro luminoso e a irradiação causaram distintos efeitos no crescimento e, especialmente, na composição bioquímica das espécies de microalgas estudadas, principalmente quanto ao teor de proteínas, polissacarídeos e clorofila.

Da mesma forma, diversos outros aspectos do metabolismo microalgal são também influenciados pelas condições luminosas. Segundo Gunkel (1970), a quantidade, qualidade e mobilidade dos pigmentos fotossintéticos, a distribuição horizontal e vertical do fitoplâncton nos corpos d'água e o tamanho e morfologia das células, dentre outros, estão correlacionados com as condições de luz, seja em quantidade quanto em qualidade.

As respostas funcionais e estruturais do fitoplâncton marinho são também dependentes de outros fatores. Olivera (1993), relata os efeitos da temperatura, da salinidade e da interação destes fatores sobre o crescimento de *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis*, sendo que, estes fatores ambientais proporcionaram significativas diferenças no crescimento destas microalgas.

Quanto à nutrição, para um crescimento ótimo as microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes. Entre as espécies, ocorrem muitas variações relacionadas principalmente à quantidade dos nutrientes no meio. Ainda assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais (ABALDE et al., 1995).

Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem C, N, O, H e P, além de Ca, Mg, S e K. Como micronutrientes, geralmente requerem Fe, Mn, Cu, Mo e Co, enquanto algumas microalgas também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GUILLARD, 1975).

É conhecido que certas microalgas têm necessidades específicas. Como reporta Uribe (1989), para o cultivo das diatomáceas é indispensável o aporte de sílica. Assimilada como ácido silícico, este elemento apresenta a capacidade de reduzir e até mesmo de deter o crescimento quando não é adicionado ou encontra-se esgotado no meio. Buitrago et al. (1994), testaram diferentes concentrações de sílica no cultivo de *Chaetoceros calcitrans*, e determinaram que o crescimento foi afetado negativamente pela redução na adição deste elemento ao meio de cultivo.

Além dos fatores anteriormente descritos, outros podem influenciar o desenvolvimento das culturas como o tamanho e a forma dos tanques, tamanho das células (volume celular), aeração das culturas, pH etc. (RICHMOND, 1990a).

3.2.1 Avaliação do Crescimento Microalgal

O crescimento é definido como um aumento da matéria viva, usualmente o número de células para microrganismos unicelulares ou a biomassa total para organismos multicelulares (TOMASELLI, 2004). Em cultivos de microalgas, e de outros microrganismos, podem ser aplicados determinados parâmetros de crescimento (empregando fórmulas) e representações gráficas para ilustrar o desenvolvimento das culturas (VONSHAK, 1990).

3.2.1.1 Curva de crescimento

Um dos métodos empregados para a avaliação do crescimento das populações microalgais em cultivo é a curva de crescimento. Esta, pode ser expressa como sendo a relação entre o incremento da biomassa ou do número de organismos num determinado volume (densidade celular) pelo tempo. Num cultivo do tipo estacionário, teoricamente, a curva de crescimento apresenta cinco fases distintas (Figura 1).

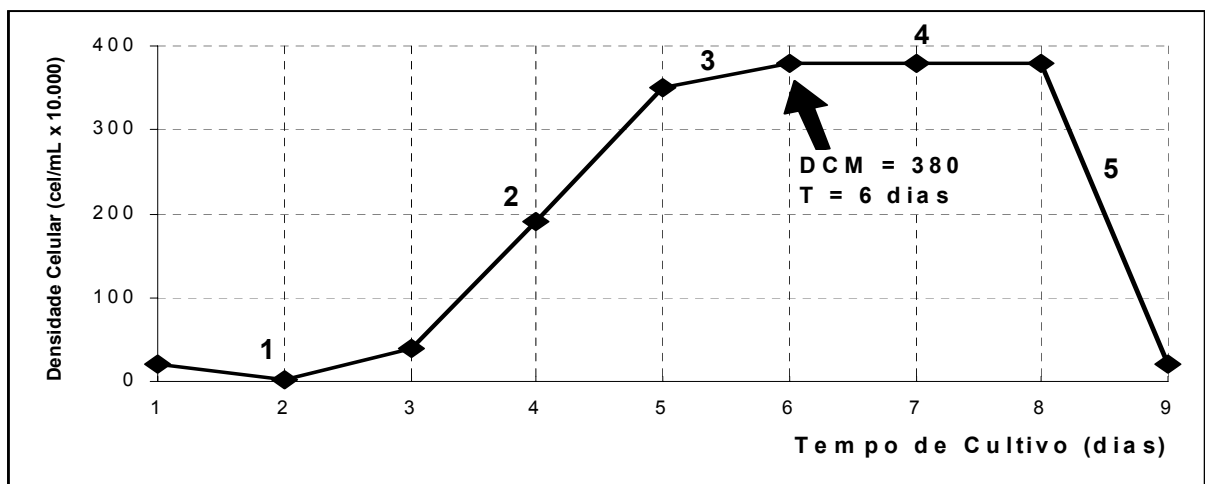


FIGURA 1 - Curva de crescimento de uma cultura microalgal num cultivo do tipo estacionário.

1 - Fase de Indução ou Fase Lag: ocorre logo após a repicagem, não existe um incremento na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo, podendo inclusive ocorrer uma redução na densidade celular;

2 - Fase Exponencial ou Fase Log: é a fase de crescimento na qual a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos regulares de tempo, ou seja, a cultura apresenta uma elevada e constante (logarítmica) velocidade (taxa) de crescimento;

3 - Fase de Diminuição do Crescimento Relativo: o tempo requerido para a duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto é consequência da diminuição na quantidade de nutrientes disponíveis no meio (os quais foram assimilados pelas microalgas) e, principalmente, da redução da atividade fotossintética devido ao incremento da densidade microalgal, sendo que desta forma, a quantidade de energia luminosa por célula microalgal torna-se bastante reduzida (autossombreamento);

4 - Fase Estacionária: nesta fase não há incremento líquido da população (a densidade celular permanece constante), a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade, podendo existir alta contaminação.

5 - Fase de Morte da Cultura: é resultado da depleção de nutrientes e do autossombreamento a um nível que não suporta o crescimento, bem como da possível ocorrência de um nível tóxico de metabólitos.

Apesar da possibilidade em representar a curva de crescimento conforme a figura anterior, nos cultivos comumente não é possível distinguir a Fase 1. Esta, pode não acontecer em todas as culturas ou ocorrer muito rapidamente. Da mesma forma, a densidade celular na Fase Estacionária pode ser caracterizada por pequenos acréscimos e decréscimos na população microalgal, sendo que, ao ajustar a curva (regressão logística) esta fase é representada graficamente por uma reta (DERNER, 1995; DERNER, 2004).

Cabe ressaltar que na inexistência de um modelo específico para representar o crescimento das microalgas, em cultivos do tipo estacionário o modelo logístico de análise de regressão pode ser aplicado (OLIVERA, 1993). Entretanto, este modelo de regressão somente pode ser empregado como ajuste para representar a curva de crescimento microalgal até ser alcançado o início da fase estacionária. A partir deste momento, além de não ocorrer incremento líquido da população, a seguir irá decrescer o número de células e, por consequência, o coeficiente de determinação da regressão (relação entre os dados obtidos e aqueles definidos pela regressão)

poderá se tornar menor do que aquele aceitável ($r^2 \geq 0,80$) em se tratando de sistemas biológicos, segundo Costa Neto (1977).

Além da diferença entre a densidade celular (ou biomassa) ao longo das diversas fases da curva de crescimento, podem existir variações na composição bioquímica das células algais, as quais é necessário que sejam conhecidas (LOURENÇO, 1996; BROWN et al., 1997).

3.2.1.2 Parâmetros de Crescimento

O crescimento de uma população microalgal pode ser estimado pelo emprego de determinados parâmetros, dentre os quais podemos destacar a **densidade celular máxima** alcançada, o **tempo de cultivo** e a **velocidade (ou taxa) de crescimento**. Segundo Olivera (1993), a densidade máxima alcançada se refere ao maior valor obtido em número de células por mililitro, e o tempo de cultivo se refere ao período transcorrido entre o início da cultura (inóculo) e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima. Já a velocidade de crescimento, é estabelecida por uma fórmula específica, citada por Stein (1973), a qual considera a densidade celular máxima e o tempo de cultivo, e representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (usualmente divisões por dia).

Como o crescimento das microalgas expressa o incremento de tamanho de uma população e não de um indivíduo, além do emprego da densidade celular, é também possível construir as curvas de crescimento empregando outras informações como: biomassa, absorvância (espectrofotômetro) e teor de pigmentos, por exemplo (ABALDE et al., 1995).

O tempo de cultivo é um parâmetro de avaliação do crescimento considerado muito importante em se tratando de cultivos em grande escala. O tempo transcorrido desde o início do cultivo até ser alcançada a densidade celular máxima é decisivo para a escolha de uma determinada espécie, do seu processo de produção e da infra-estrutura necessária para o cultivo (BROWN et al., 1997).

Nos sistemas comerciais de produção de microalgas, além do tempo despendido até ser verificada a máxima densidade celular, o parâmetro tempo de cultivo pode ser expresso como sendo o período necessário para que a biomassa

alcance o maior valor nutricional para a espécie de organismo que se quer alimentar (larvas de camarão, por exemplo). Ainda, o momento no qual a biomassa apresenta o maior conteúdo de um determinado composto de interesse. De maneira geral, as empresas produtoras de microalgas visam alcançar a máxima produtividade e, isto implica numa elevada produção de biomassa (ou do produto de interesse) no menor espaço de tempo possível (TREDICI, 2004).

A **produtividade** ou o **rendimento** das culturas, ou ainda o rendimento em relação a algum composto de interesse, pode ser expresso de várias maneiras. Segundo Tredici (2004), é possível representar este item como **produtividade volumétrica** (g de biomassa seca/L/dia ou mg de proteínas/L/dia, por exemplo), **produtividade por área** (g/m²/dia, por exemplo) ou **produtividade por área de superfície iluminada** (g/m²/dia, por exemplo). Conforme Richmond (2004), a relação produtividade/dia só está correta quando empregada em cultivos externos, sujeitos às variações da intensidade luminosa, do fotoperíodo natural e das condições atmosféricas. Para expressar a produtividade das culturas em laboratório, onde são utilizadas iluminação artificial e condições controladas, é correto empregar produtividade/hora, sendo que a opção por um destes métodos depende notadamente do tipo de cultivo.

3.2.2 A Importância do Carbono

Tal como as plantas, pelo processo fotossintético as microalgas fotoautotróficas captam a energia solar e a armazenam (fase fotoquímica) na forma de adenosina tri-fosfato – ATP e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – NADPH. Estes compostos, são usados como fonte de energia (fase química) para sintetizar carboidratos (glicose pelo Ciclo de Calvin) e outros compostos orgânicos celulares a partir da água e da redução do CO₂ (LEHNINGER, 1990).

A via de fixação do carbono inorgânico envolve a enzima Ribulose Difosfato Carboxilase (Rubisco). Do carbono fixado, uma parte é usada para a manutenção celular e para o crescimento, enquanto outra parte é estocada, sendo que, a forma de armazenamento é altamente variada entre as classes de microalgas e a

quantidade de carbono estocada é dependente das condições ambientais (FALKOWSKI; RAVEN, 1997).

Nos cultivos, o carbono é considerado como o macronutriente mais importante, uma vez que constitui ao redor de 50% da biomassa microalgal, sendo que, comumente o crescimento das microalgas encontra-se limitado por deste composto (ABALDE et al., 1995; GROBBELAAR, 2004a).

Segundo Falkowski e Raven (1997), a maioria do carbono existente na Terra está numa forma oxidada (inorgânica) e combinada com oxigênio molecular, formando dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) ou carbonato (CO_3^{2-}).

Tanto no ambiente natural, quanto numa cultura de microalgas, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO_2 , H_2CO_3 (ácido carbônico), HCO_3^- ou CO_3^{2-} e suas proporções dependem do pH. Quanto mais ácido maior a proporção de CO_2 (livre), enquanto que, com a elevação do pH as proporções bicarbonato e carbonato aumentam no meio (ESTEVES, 1988). Conforme Soares-Gomes e Figueiredo (2002), as formas mais abundantes nos oceanos são o bicarbonato e o carbonato, especialmente devido ao pH dos oceanos estar geralmente entre 8,2 e 8,6.

O CO_2 é a fonte de carbono preferida pelas microalgas, uma vez que se difunde rapidamente (difusão passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de fixação. Já o bicarbonato, é incorporado ativamente, gerando um gasto energético para suportar este processo (RAVEN, 1988).

Em populações microalgais muito densas a própria atividade fotossintética implica numa redução do nível de CO_2 (e no aumento da alcalinidade), podendo alcançar valores próximos de zero, tornando limitante o crescimento microalgal, especialmente daquelas espécies incapazes de utilizar bicarbonato (BONEY, 1989; ABALDE, 1995).

Em cultivos fotoautotróficos, o dióxido de carbono disponibilizado para as células microalgais, tanto pode ser proveniente (por difusão) do ar atmosférico (0,036% de CO_2) injetado na cultura na forma de bolhas ou proveniente de cilindros pressurizados contendo este gás (SILVA et al., 2003).

Segundo Grobbelaar (2004a), ao contrário do que ocorre com as plantas terrestres, o CO₂ atmosférico não satisfaz quantitativamente os requerimentos de carbono em culturas intensivas de microalgas. Para a obtenção de altas taxas de crescimento sob condições autotróficas, o suprimento de CO₂ e/ou HCO₃⁻ é fundamental. Nas culturas, o CO₂ proveniente (por difusão) do ar atmosférico somente pode sustentar uma produtividade de aproximadamente 10 g de biomassa seca/m²/dia, enquanto que até 70 g de biomassa seca/m²/dia tem sido obtida com o enriquecimento do meio com CO₂. Concluindo, esta baixa disponibilidade de carbono causa limitação do crescimento microalgal nos cultivos (OLAIZOLA; DUERR; FREEMAN, 1991; ISHIDA et al., 2000).

Ainda que a principal fonte de carbono empregada nos cultivos seja o dióxido de carbono, diversos estudos têm comprovado que as microalgas podem crescer empregando diferentes rotas nutricionais e, especialmente utilizando compostos orgânicos como glicose, acetato, lactato, aminoácidos ou outros substratos (SOONG, 1980; DARLEY, 1982; ÁLVAREZ; GALLARDO, 1989; KAPLAN et al., 1990; RICHMOND, 1990b; CERÓN GARCÍA et al., 2000; WEN; CHEN, 2000b; ZASLAVSKAIA et al., 2001).

Conforme Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), conforme a fonte de carbono empregada e a utilização ou não de energia luminosa, os cultivos podem ser assim classificados:

Cultivo autotrófico (ou fotoautotrófico) – emprego de luz como exclusiva fonte energética, para a redução (fixação) do CO₂ (considerado de fonte inorgânica) pela oxidação de substratos, principalmente água, com liberação de O₂;

Cultivo heterotrófico – emprego exclusivo de compostos orgânicos, sem a utilização de luz. O carbono orgânico serve tanto como fonte energética quanto para a construção de biomassa.

Cultivo mixotrófico – utilização simultânea de uma fonte luminosa e substrato orgânico como fonte de energia, bem como o CO₂ e o substrato orgânico como fontes de carbono. Em relação ao metabolismo dos organismos, a fotossíntese é a principal fonte energética, embora o carbono orgânico e o CO₂ sejam essenciais;

Dependendo do metabolismo microalgal e não das condições de cultivo, o **cultivo heterotrófico** pode ainda ser subdividido em duas variantes:

Cultivo químico-heterotrófico – utilização de fonte orgânica de energia e fonte orgânica de carbono;

Cultivo Foto-heterotrófico – a luz é necessária (como fonte de energia) para assimilação do carbono orgânico.

É certo que dependendo do tipo de cultivo desenvolvido, a taxa de crescimento, a produtividade e especialmente a composição bioquímica da biomassa poderão sofrer intensas alterações (LEE, 2004).

Nos cultivos, o emprego de fontes suplementares de carbono pode potencializar a taxa de crescimento, bem como, gerar uma maior biomassa e maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados (APT; BEHRENS, 1999; CERÓN GARCÍA et al., 2005).

Como fonte orgânica os açúcares são os substratos mais utilizados para os cultivos heterotróficos e mixotróficos de microalgas (CID; ABALDE; HERRERO, 1992). Os mesmos autores reportam que em cultivos de *Tetraselmis suecica* o emprego de fontes orgânicas de carbono (estrato de levedura, glicose e peptona) melhorou significativamente o crescimento, chegando a obter densidades celulares três vezes superiores àquelas obtidas em cultivos fotoautotróficos.

Becker e Venkataraman (1984), reportam que em cultivos de *Scenedesmus* sp. empregando como substrato de carbono orgânico glicose, manose, sucrose, frutose ou galactose o crescimento foi favorecido com todas as fontes avaliadas e que a glicose demonstrou ser a melhor fonte para esta espécie de microalga.

Segundo Chen e Zhang (1997) o uso de fontes suplementares de carbono é justificado, uma vez que o autossombreamento causado pela elevada densidade celular reduz a disponibilidade de luz, limitando severamente a produção de biomassa (CHEN, 1996). Uma estratégia para melhorar a eficiência da utilização da luz ou eliminar seu requerimento pelas células algais e/ou reduzir os custos da produção da biomassa envolvem o crescimento mixotrófico ou heterotrófico. A necessidade de elevada iluminação para suportar o crescimento em culturas com

uma alta densidade celular poderia ser parcialmente resolvida pela adição de fontes suplementares (orgânicas) de carbono numa concentração adequada (CERÓN GARCÍA et al., 2005).

Além disso, segundo Harel e Place (2004), a produção fotossintética tanto em tanques externos quanto em fotobioreatores pode ser considerada muito dispendiosa, uma vez que as culturas precisam ser mantidas em baixas densidades (1 – 2 g/L) devido ao efeito adverso do autossombreamento na produtividade dos cultivos. Assim, a produção heterotrófica pode acarretar redução dos custos de produção, bem como, permitir a obtenção de uma elevada densidade celular (> 75 g/L de biomassa seca).

A escolha de um ou outro método depende das espécies (cepas) empregadas e dos produtos de interesse (biomassa, ácidos graxos, pigmentos etc.) que as microalgas podem sintetizar naquelas condições de cultivo. O cultivo heterotrófico tem sido desenvolvido para a produção de ácidos graxos por algumas espécies de microalgas, entretanto este tipo de cultivo geralmente não pode ser aplicado para a obtenção de pigmentos uma vez que as células microalgais não necessitariam captar luz para o processo fotossintético (JIANG; CHEN; LIANG, 1999).

O emprego de cultivos mixotróficos ou fotoheterotróficos pode levar as células à síntese de compostos característicos tanto de cultivos fotoautotróficos quanto heterotróficos, bem como, pode implicar em altas taxas de produção de biomassa (CERÓN GARCÍA et al., 2005). Uma vez que num cultivo mixotrófico o CO₂ e o carbono orgânico são simultaneamente assimilados, este tipo de cultivo pode ser o processo mais eficiente para a produção de biomassa microalgal, visto que implica em uma economia na energia gasta para a síntese de todo o aparato fotossintético e para a fixação do carbono (LEE, 2004).

Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), existe a necessidade de um melhor entendimento das diferenças metabólicas e dos requerimentos de energia e carbono pelas microalgas visando a produção de compostos com elevado valor como pigmentos, antioxidantes, tocoferóis, enzimas etc., os quais podem ser usados nas indústrias química, biomédica e alimentícia.

3.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE

Em todos os organismos, além daqueles compostos envolvidos no metabolismo primário (os quais são determinantes das funções vitais básicas de um ser vivo) como os ácidos nucleicos, açúcares e proteínas por exemplo, ou ainda, a clorofila das algas e vegetais, existem também os produtos naturais (ou metabólitos secundários) como pigmentos acessórios, substâncias de defesa química contra a ação de microrganismos ou inimigos naturais etc. (TEIXEIRA, 2002). Segundo o mesmo autor, 25 % dos fármacos comercializados são drogas derivadas de produtos naturais de plantas e cerca de 12 % oriundos de microrganismos e, somente no ano de 1992, mais de 500 novos metabólitos bioativos foram isolados de organismos marinhos.

Segundo Brown, Jeffrey e Garland (1989), entre 90 a 95 % da biomassa seca das microalgas são constituídos por proteínas, carboidratos, lipídios e minerais, sendo o restante por ácidos nucleicos. Além da variação na concentração destes compostos estar em função das condições de cultivo, também é característica das diferentes classes.

Diversas microalgas vêm sendo estudadas e algumas espécies têm sido amplamente empregadas na aquicultura, na alimentação humana e animal, na agricultura, no tratamento de águas residuais, na redução do dióxido de carbono da atmosfera, em substituição aos combustíveis fósseis e na obtenção de inúmeros compostos (GUILLARD, 1975; GOLDMAN, 1977; BECKER, 1988; BOROWITZKA, 1988a; BOROWITZKA, 1988b; DE PAUWN; PERSOONE, 1988; METTING, 1988; OSWALD, 1988; BOROWITZKA, 1994; MOLINA GRIMA et al., 1995; LOURENÇO, 1996; VÍLCHEZ et al., 1997; ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000; RICHMOND, 2004).

Além da consolidada produção de microalgas para a obtenção de biomassa, as pesquisas relacionadas ao cultivo de microalgas ampliaram as perspectivas para a produção de novos combustíveis, biopolímeros, biofertilizantes, pesticidas, ácidos graxos e pigmentos, assim como de inúmeros outros compostos bioativos que podem ser empregados em alimentos funcionais (SKULBERG, 2000; SKULBERG, 2004).

Reconhecidamente, as microalgas têm a capacidade de sintetizar compostos considerados como nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico - EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides (astaxantina, beta-caroteno, luteína e cantaxantina etc.) que apresentam propriedades terapêuticas (GILL; VALIVETY, 1997; OHSHIMA, 1998; TRIPATHI et al., 1999).

Atualmente as microalgas são comercializadas como alimento natural (“health food”) ou suplemento alimentar e são encontradas em pó (“sun dried” ou “spray-dried”), na forma de tabletes, cápsulas ou extratos. Microalgas são também incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas etc., tanto como suplemento nutricional quanto como corante natural (BECKER, 2004; COLLA; BERTOLIN; COSTA, 2004; PULZ; GROSS, 2004).

O desenvolvimento e a produção de compostos bioativos naturais (“natural bioactive compounds” – NBCs), pelo emprego de biotecnologia, apresenta elevada significância nutricional e aplicações farmacêuticas. Tais compostos são nutrientes que tem papel estrutural e/ou funcional no corpo, atuando como nutrientes essenciais ou agentes terapêuticos que podem ser aplicados numa ampla variedade de produtos como suplementos dietéticos, ingredientes alimentares, alimentos infantis e étnicos bem como em terapias farmacêuticas (www.omegadha.com, acesso em 20/8/2001).

Algumas espécies são bem conhecidas quando ao potencial de cultivo e quanto aos compostos que sintetizam. Na Tabela 1 são apresentados alguns destes compostos obtidos das microalgas e suas aplicações.

TABELA 1- Alguns produtos obtidos de microalgas.*

	Produto	Aplicações
Biomassa	Biomassa	“health food” Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aqüicultura Condicionador do solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas (astaxantina e cantaxantina) Luteína Beta-caroteno Vitamina C e E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos graxos	Ácido araquidônico - ARA Ácido eicosapentaenóico - EPA Ácido docosahexaenóico - DHA Ácido gama-linolênico - GGA Ácido linoléico – LA	Aditivos alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase – SOD Fosfoglicerato quinase – PGK Luciferase e Luciferina Enzimas de restrição	“health food” Pesquisa Medicina
Polímeros	Polissacarídeos Amido Ácido poli-beta-hidroxitirico - PHB	Aditivos alimentares Cosméticos Medicina
Produtos especiais	Peptídeos Toxinas Isótopos Aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico) Esteróis	Pesquisa Medicina

* Fonte: Barbosa (2003).

Como as microalgas são um grupo extremamente diverso de organismos, esta diversidade também se apresenta na sua composição bioquímica e, assim como os fatores tanto biológicos quanto físicos e químicos influenciam o crescimento das microalgas, a composição bioquímica pode ser alterada significativamente pelas condições de cultivo. Por esta razão, as microalgas são fonte potencial de uma quase ilimitada gama de compostos (BOROWITZA, 1993).

Visto que os fatores ambientais e nutricionais exercem um marcado efeito na morfologia e na composição bioquímica celular, pode-se considerar isto como uma vantagem, uma vez que dentro de certos limites é possível se obter uma biomassa microalgal com a composição bioquímica celular desejada (FÁBREGAS et al., 1994; ARREDONDO-VEGA, 1995; OTERO et al., 1995).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de avaliar o efeito de diversos fatores na composição bioquímica das células algais, sendo que, poucos destes estudos têm sido realizados em condições definidas de cultivo e as microalgas empregadas numa fase específica da curva de crescimento, o que gera grande dificuldade analítica dos dados (LOURENÇO, 1996; FERNÁNDEZ-REIRIZ et al., 1989; ROUSCH; BINGHAM; SOMMERFELD, 2003). Esta afirmação decorre do fato de que comprovadamente distintas condições de cultivo como intensidade luminosa, quantidade e qualidade dos nutrientes no meio de cultura, fotoperíodo, temperatura, entre outros fatores, podem alterar a composição bioquímica das células algais, (DARLEY, 1982; LAING, 1985; FÁBREGAS et al., 1989).

A influência da irradiação na composição bioquímica de espécies fitoplanctônicas foi estudada por Thompson, Harrison e White (1990), Harrison, Thompson e Calderwood (1990) e Thompson, Guo e Harrison (1993), sendo que, estes autores relatam variações consideráveis tanto no tipo de ácidos graxos encontrados, quanto na quantidade dos mesmos em relação à luz. Também, Renaud et al. (1991) reportam que alterações no conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios foram produzidos pela variação na intensidade luminosa nas microalgas *Isochrysis* sp. e *Nannochloropsis oculata*, quando cultivadas em grande escala.

Da mesma forma, Mendes e Wagener (2001), verificaram que o emprego de luz solar concentrada (pelo emprego de refletores) acarretou num aumento de até 270% na produtividade de *Spirulina platensis*, enquanto causou uma redução na concentração de proteínas e ficocianina e, um aumento no teor de carboidratos, clorofila e DNA na biomassa microalgal.

Quanto aos nutrientes, Herrero e Cid (1990) relatam as diferenças no conteúdo celular de algumas espécies de microalgas, ocasionadas pela utilização de diferentes meios de cultura.

Buitrago et al. (1994) testaram em larvicultura de *Farfantepenaeus paulensis* (camarão rosa) o emprego da microalga *Chaetoceros calcitrans* (diatomácea) cultivada com diferentes concentrações de sílica. Estes autores constataram que as larvas alimentadas com aquelas microalgas cultivadas em menor concentração de sílica apresentaram melhor desenvolvimento, o qual é reflexo do maior valor

nutricional da biomassa microalgal. O resultado parece indicar que, as células microalgais que cresceram no ambiente limitado de sílica sofreram uma alteração da fisiologia celular e, segundo Kyle et al. (1986), a baixa disponibilidade de sílica induz nas diatomáceas um aumento na produção de lipídios.

3.3.1 Os Ácidos Graxos Poliinsaturados

Nos sistemas biológicos os lipídios funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e como fonte de energia, sendo que grande parte dos lipídios é constituída pelos ácidos graxos. Os triacilgliceróis (TAG) – três ácidos graxos unidos a um glicerol – podem ser considerados a principal fonte energética da maioria dos organismos (LEHNINGER, 1990). Nos vegetais os TAG podem ser estocados nas sementes, como reserva energética para o processo de germinação, enquanto que nos microrganismos os TAG podem ser estocados em organelas específicas ou como gotículas de óleo dentro das células (SWAAF, 2003).

Jiang, Chen e Liang (1999) relatam que a significância terapêutica dos ácidos graxos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids - PUFA) tem sido demonstrada por diversos estudos clínicos e epidemiológicos. Aos ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) são atribuídas propriedades benéficas à saúde, associadas ao consumo de certos peixes marinhos e seus óleos. O DHA se acumula nas membranas do sistema nervoso humano, no tecido visual e reprodutivo e, é também o ácido graxo mais abundante na massa cinzenta do cérebro. Desta forma, os PUFA têm função na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da aterosclerose e arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídios no plasma, da artrite reumatóide, do câncer e são aparentemente essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral (PIGOTT; TUCKER, 1990; RADWAN, 1991; BOROWITZA, 1993; FÁBREGAS et al., 1994; FRANKE et al., 1997; GILL; VALIVETY, 1997; SIMOPOULOS, 2002).

Uma grande importância tem sido dada à provisão das fontes de ácidos graxos poliinsaturados. Isto é devido às mudanças na dieta humana, nos últimos séculos, e ao acentuado aparecimento de uma série de doenças relacionadas ao

baixo consumo destes compostos, bem como à sua reconhecida significância terapêutica, especialmente àqueles da família ômega-3 ou n-3 (SIMOPOULOS, 2002).

Os peixes marinhos são uma conhecida fonte destes compostos nutricionalmente muito importantes, entretanto, existem consideráveis evidências indicando que os PUFA encontrados nos óleos de peixes provêm da ingestão de organismos que constituem o zooplâncton, os quais têm as microalgas como seu principal alimento. Desta maneira, através da cadeia trófica, os PUFA sintetizados e acumulados pelas microalgas chegam até os peixes (ROBLES MEDINA et al., 1998). Por isso, estas são consideradas como uma das mais promissoras fontes destes compostos (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

Em comparação com os peixes, a biomassa microalgal obtida nos cultivos é caracterizada por ser livre de contaminação e, a uniformidade na produção é independente de sazonalidade. Também, quando comparadas com as oleaginosas, certas microalgas têm significativamente maior espectro de ácidos graxos poliinsaturados, alguns com cadeias com mais de 18 átomos de carbono (BELARBI; MOLINA; CHISTI, 2000; WEN; CHEN, 2000a).

Peixes como bacalhau, savelha, arenque, anchova e sardinha contêm uma alta proporção de gordura e são empregados na obtenção de PUFA, entretanto os produtos extraídos destas fontes podem apresentar vários problemas: odor desagradável, contaminação com metais pesados, baixa estabilidade, presença de colesterol, produção variável e um complexo perfil de ácidos graxos, podendo apresentar mais de 50 tipos diferentes (ROBLES MEDINA et al., 1998). Em contraste, os ácidos graxos das microalgas não apresentam as desvantagens citadas. Além disso, nos cultivos microalgais as condições de cultivo podem ser controladas e as espécies podem ser selecionadas de acordo com o ácido graxo requerido, bem como, uma vez que apresentam uma composição mais simples, o processo de purificação é facilitado (ZITTELLI et al., 1999; WEN; CHEN, 2003).

Os ácidos graxos podem ser obtidos de fontes animais e vegetais, tanto terrestres quanto aquáticos, entretanto os microrganismos têm sido considerados como uma alternativa às fontes usuais e, diversos deles têm sido estudados como fonte desta classe de lipídios (CERTIK; SHIMIZU, 1999). Por outro lado, conforme

Ratlidge (2001), a produção de óleo a partir de organismos unicelulares (“single cell oil” – SCO) é um conceito relativamente novo.

Os lipídios são principalmente estocados nos vacúolos como um material de reserva, sendo que, o conteúdo de lipídios armazenado pelas microalgas pode ser bastante elevado em relação à quantidade total dos demais compostos (CUPP, 1943; COBELAS; LECHADO, 1989; CRYSMADHA; BOROWITZKA, 1994).

Dentre as diversas classes de microalgas que têm sido estudadas visando à obtenção dos PUFA, segundo Kyle et al. (1986), as diatomáceas marinhas sempre são consideradas, uma vez que contêm abundância de lipídios e que os ácidos graxos da série n-3 são os principais componentes da fração lipídica. Segundo Brown (1991), os níveis de ácidos graxos altamente insaturados (EPA e DHA) são maiores nas diatomáceas que em algumas das outras classes de microalgas. Nesta classe, os principais produtos de reserva são os lipídios (TAG) e um carboidrato denominado crisolaminarina (TOMASELLI, 2004).

Segundo Falkowski e Raven (1997), a característica apresentada por muitas espécies de microalgas em estocar grandes quantidades de lipídios de reserva, deve-se provavelmente a uma resposta evolutiva, ou seja, a seleção natural presumivelmente favoreceu aquelas espécies que acumulam suficiente reserva energética para atravessar períodos desfavoráveis. Conforme os mesmos autores, as diatomáceas podem acumular grande quantidade de lipídios de reserva em ambientes com elevada iluminação e, podem sobreviver por extensos períodos de tempo no escuro, consumindo lentamente suas reservas energéticas (em zonas de ressurgência, por exemplo). Esta estratégia facilita a rápida retomada do crescimento no momento em que as condições ambientais se tornarem favoráveis.

O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% da biomassa seca e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004). Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados, quanto mono ou poliinsaturados. Nas microalgas, os ácidos graxos correspondem a maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os PUFA representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1988; BROWN, 1991; BECKER, 2004).

Os lipídios de algumas espécies marinhas contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, notadamente dos ácidos eicosapentaenóico 20:5(n-3) e docosahexaenóico 22:6(n-3) (VOLKMAN et al., 1989; ZHUKOVA; AIZDAICHER, 1995; ROBLES MEDINA et al., 1998). Na Tabela 2 são apresentados alguns PUFA e suas fontes.

TABELA 2 - Fontes de ácidos graxos poliinsaturados e microrganismos produtores*.

Ácido Graxo	Fontes convencionais	Microrganismos produtores
GLA	Vegetais	Fungos e Microalgas (<i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>)
DGLA	Leite humano, tecidos animais, peixes e musgos	Fungos
AA	Tecidos animais, peixes e musgos	Fungos e Microalgas (<i>Porphyridium cruentum</i> e <i>Euglena gracilis</i>)
microalga	Tecidos animais	Fungos
EPA	Peixes (arenque e savelha), crustáceos (siri azul e lagosta) e moluscos (ostras e mexilhões)	Fungos, Microalgas (<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Monodus subterraneus</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Amphidinium carteri</i> e <i>Thalassiosira pseudonana</i>) e Bactérias
ETA	Tecidos animais	Fungos
DPA	Peixes	Fungos
DHA	Peixes (Atum, arenque, bacalhau, sardinha, salmão e savelha), crustáceos (siri azul e lagosta) e moluscos (ostras e mexilhões)	Fungos, Microalgas (<i>Cryptocodium cohnii</i> , <i>Gyrodinium nelsoni</i> , <i>Amphidinium carteri</i> , <i>Gonyaulax polyedra</i>) e Bactérias

* Adaptado de Certik e Shimizu (1999). GLA = ácido gama-linolênico, DGLA = ácido dihomogama-linolênico, AA = ácido araquidônico, MA = ácido "mead" eicosatrienóico, EPA = ácido eicosapentaenóico, ETA = ácido eicosatetraenóico, DPA = ácido docosapentaenóico, DHA = ácido docosahexaenóico.

Dentre as espécies conhecidas de microalgas que apresentam quantidades significativas de PUFA das famílias ômega-3 e ômega-6, encontram-se algumas pertencentes às Classes Chrysophyceae (*Isochrysis* spp. e *Pavlova lutheri*), Bacillariophyceae (*Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira* spp., *Odontella aurita*), Dinophyceae (*Cryptocodium cohnii*), Rodophyceae (*Porphyridium cruentum*) e em menor quantidade em algumas algas pertencentes à Chlorophyta (YONGMANITCHAI; WARD, 1989).

Além da variação na qualidade dos ácidos graxos entre diferentes espécies, o conteúdo total de ácidos graxos também varia. Nos cultivos, o conteúdo e a

composição dos ácidos graxos podem ser manipulados pela alteração nas condições ambientais, sendo que, o melhoramento genético com essa finalidade vem sendo empregado (BOROWITZA, 1988).

Segundo Borowitzka (1993), uma das áreas de interesse recente é a produção de substâncias biologicamente ativas, com possíveis aplicações na saúde humana e animal, e que o estudo das microalgas para a produção destes compostos de interesse ainda está na infância. Isto inclui a avaliação do potencial de novas espécies e o estudo detalhado da biologia e fisiologia das microalgas. Segundo o mesmo autor, a indústria da biotecnologia microalgal necessita continuar desenvolvendo mercado para os produtos algais e, apesar das limitações (elevado custo de produção, baixa eficiência na utilização da luz, padronização da produção etc.), o uso das microalgas como fonte de valiosos compostos está estabelecido e nos próximos anos deverá acontecer uma continuada expansão no número de produtos comercialmente disponíveis empregando este recurso.

Conforme Pulz e Gross (2004) os ácidos graxos poliinsaturados de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia e, em especial, na indústria de alimentos funcionais.

Desta forma, há uma necessidade de quantificação do efeito de determinadas condições de cultivo no metabolismo algal e na produção dos compostos de interesse, o que exige o conhecimento sobre as espécies e/ou cepas produtoras e dos fatores que influenciam o crescimento e a composição bioquímica (MOLINA GRIMA et al., 1995; SHEEHAN et al., 1998).

Quanto ao carbono, Tsuzuki et al. (1990), relatam que a adição de CO₂ (proveniente de cilindros) às culturas microalgais influencia na quantidade de lipídios e no grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo portanto, este um nutriente essencial nos cultivos de microalgas.

3.4 A PRODUÇÃO COMERCIAL

O cultivo de microalgas, para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese, trata-se de uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países e a produção está a cargo de grandes empresas. Na Tabela 3 são apresentados os nomes de algumas empresas, sua localização, as microalgas cultivadas, os produtos e as atividades biológicas destes produtos.

TABELA 3 - Empresas, localização, microalgas cultivadas, seus produtos e a atividade biológica atribuída*.

Empresa	País	Microalga (gênero)	Produto	Atividade biológica atribuída
Martek/Omegatech	USA	<i>Cryptocodinium</i>	DHA	Desenvolvimento cerebral e da visão, redução do colesterol
Cyanotech	USA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	Tratamento da Síndrome do Túnel do Carpo, pigmentação da carne de salmões cultivados, melhora da resposta imunológica
MERA	USA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	Antiinflamatório, antioxidante, tratamento de lesões musculares
OceanNutrition	Canadá	<i>Chlorella</i>	Extrato de carboidratos	Melhora da resposta imunológica, antigripal ("anti-flu")
InnovalG	França	<i>Odontella</i>	EPA	Antiinflamatório
Panmol/Madaus	Áustria	<i>Spirulina</i>	Vitamina B₁₂	Melhora da resposta imunológica, acelera a cicatrização,
Nutrinova/Celanese	Alemanha	<i>Ulkenia</i>	DHA	Tratamento de doenças cerebrais e cardíacas

* Adaptado de Pulz e Gross (2004).

Apesar de ser uma atividade consolidada em alguns países, a produção comercial de microalgas no Brasil somente é realizada por empresas que produzem a biomassa e a empregam na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos, por exemplo. Não há informações da produção em grande escala para a obtenção de biomassa ou para a extração de compostos bioativos visando outras aplicações, somente existem iniciativas de caráter experimental em

diversos centros de pesquisa e, em geral, trabalhando isoladamente (DERNER et al., 2006).

Além das substâncias conhecidas, a quantidade de compostos de interesse comercial que podem ser obtidos das microalgas parece ser imprevisível. Devido ao crescente interesse em tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas na obtenção de produtos para o consumo humano, existe a necessidade de uma contínua busca por espécies e/ou variedades capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos e de como é possível potencializar a síntese destes (condições de cultivo, melhoramento genético etc.). Igualmente, há a necessidade de pesquisas visando ao desenvolvimento e, principalmente ao aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala comercial a fim de tornar comercialmente viáveis alguns dos sistemas conhecidos. Também se faz necessária a identificação dos produtos que podem ser extraídos das microalgas, da possível atividade biológica (estudos clínicos, metabólicos e toxicológicos) e do desenvolvimento de mercados específicos para estes (PULZ; GROSS, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Nos cultivos experimentais foram empregadas microalgas das espécies *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*. Estas espécies foram escolhidas por apresentarem tecnologia de produção conhecida o que sem dúvida facilitou o desenvolvimento dos cultivos.

4.1.1 *Chaetoceros muelleri*, Lemmerman, 1898

Reino Protista
Filo Heterokontophyta
Classe Bacillariophyceae
Ordem Biddulphiales
Subordem Biddulphiineae
Família Chaetocerotaceae
Gênero *Chaetoceros*
Espécie *Chaetoceros muelleri*

A cepa desta espécie (Figura 2) foi adquirida do Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP), Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, Maine, Estados Unidos, sob o código CCMP 1316. Esta espécie quando cultivada em meio líquido e com agitação da cultura, apresenta células individuais (não formando cadeias). As células são de coloração marrom e medem de 5 a 10 μm de comprimento.



FIGURA 2 - Microfotografia da microalga *Chaetoceros muelleri*.

4.1.2 *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt, 1926

Reino Protista

Filo Heterokontophyta

Classe Bacillariophyceae

Ordem Biddulphiales

Subordem Coscinodiscineae

Família Thalassiosiraceae

Gênero *Thalassiosira*

Espécie *Thalassiosira fluviatilis*

A cepa de *T. fluviatilis* (Figura 3) foi recebida como doação do Centro de Investigaciones Marinas (CIM) da Universidad de La Havana, Cuba. Esta microalga apresenta células de forma cilíndrica, de cor marrom esverdeada e com 12 a 14 μm de comprimento. Como a espécie anterior, *T. fluviatilis* apresenta células individuais (não formando cadeias) quando cultivada em meio líquido e com agitação. Na literatura a denominação *T. weissflogii* é empregada como sinônimo de *T. fluviatilis*.



FIGURA 3 - Microfotografia da microalga *Thalassiosira fluviatilis*.

As cepas das espécies citadas foram primeiramente mantidas no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), do Departamento de Aqüicultura (AQI), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram tratadas com antibióticos (Provasoli's Antibiotic Concentrated Solution, SIGMA, a 0,5%, segundo Solomon et al., 2003) para a eliminação da carga bacteriana.

Após este tratamento as cepas foram transferidas para o Laboratório de Biotecnologia Alimentar - BIOTEC, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CAL, CCA, UFSC, onde foram mantidas em Câmara de Germinação até o início dos experimentos.

4.2 MEIO DE CULTURA

As culturas foram desenvolvidas com Meio F/2 de Guillard (GUILLARD, 1975), modificado, empregado no LCM, apresentado na Tabela 4. O Meio F/2 foi utilizado neste trabalho por ser amplamente empregado no cultivo de microalgas marinhas e, apropriado para as espécies *C. muelleri* e *T. fluviatilis*. A água marinha (oceânica) empregada nos cultivos foi previamente filtrada num conjunto de filtros de cartucho com porosidade decrescente (50, 5, 1 e 0,5 μm) e armazenada em local escuro por 30 dias. Nos frascos de cultivo o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 125°C, numa pressão de 1,3 Kgf/cm² por 30 minutos, em seguida foi mantido em ambiente asséptico, no escuro e numa temperatura de 22°C durante 2 dias.

TABELA 4 - Composição do Meio F/2 de GUILLARD (1975) modificado, empregado nas culturas microalgais.

1. Solução de Nitrato	
NaNO ₃ -----	150,0 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O -----	8,0 g
EDTA Na ₂ -----	10,0 g
Sol. Traços de Metais -----	2,0 mL (de cada solução)
Água destilada -----	a 1,0 L
Adicionado 0,65 mL para cada litro de água do mar.	
Solução de Metais-traço	
ZnCl ₂ .7H ₂ O -----	1,65 g
CoCl ₂ .6H ₂ O -----	1,50 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O -----	0,60 g
CuSO ₄ .5H ₂ O -----	1,47 g
MnCl ₂ . 6H ₂ O -----	27,0 g
Água destilada para cada solução -----	a 150,0 mL
2. Solução de Fosfato	
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O -----	16,0 g
Solução de Biotina -----	1,0 mL
Solução de Cianocobalamina -----	1,0 mL
Tiamina -----	0,2 g
Água destilada -----	a 1,0 L
Adicionado 0,65 mL para cada litro de água do mar.	
Solução de Biotina	
Biotina -----	0,125 g
Água destilada -----	125 mL
Solução de Cianocobalamina	
Cianocobalamina -----	0,125 g
Água destilada -----	125 mL
3. Solução de Silicato	
Silicato de Sódio (H-300, QUIMIDROL) -----	80,0 g
Água destilada -----	a 1,0 L
Adicionado 1,00 mL para cada litro de água do mar.	
4. Solução de TRIS	
Tris (Hidroximetil Aminometano) -----	50,0 g
Ácido clorídrico PA -----	35,0 mL
Água destilada -----	470,0 mL
Adicionado 5,0 mL para cada litro de água do mar, para esterilizar o meio em autoclave.	
Obs.: Todas os compostos são de grau analítico, exceto o Silicato de Sódio (grau industrial).	

4.3 ACLIMATAÇÃO PRÉVIA

Antes do início dos experimentos, a partir dos tubos de cultura estoque, foram desenvolvidas culturas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL e posteriormente de 1.000 mL, nos quais foi feita a aclimatação química e física às condições de cultivo,

conforme Voltolina et al. (1998). A aclimação foi desenvolvida durante uma semana, permitindo assim que as microalgas estivessem adaptadas quando então foram empregadas como inóculo, sempre em fase exponencial de crescimento.

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos experimentais foram realizados no Cepário do BIOTEC, CAL, CCA, UFSC. Cada unidade experimental consistiu de uma cultura microalgal, desenvolvida em frasco de vidro do tipo Erlenmeyer, com capacidade para 2,0 L (Figura 4), contendo 1,6 L de meio de cultura.

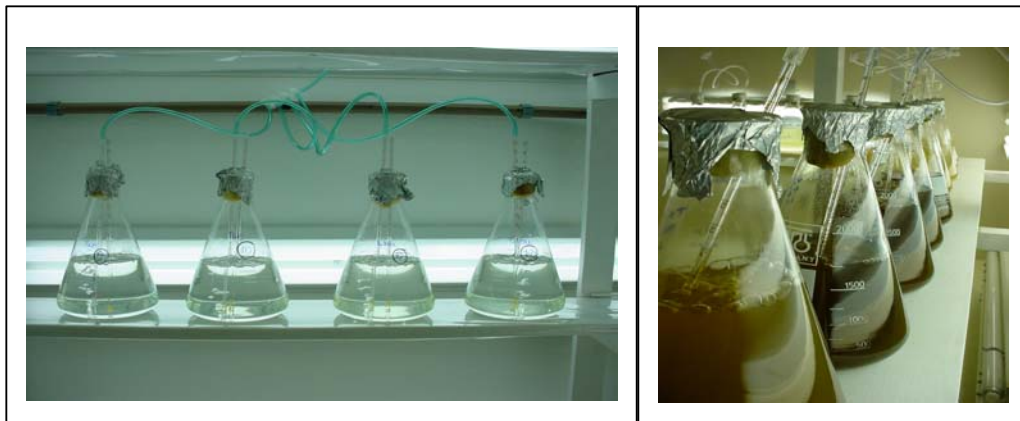


FIGURA 4 - Frascos de cultura de *C. muelleri* e *T. fluviatilis* empregados nos experimentos.

Todas as culturas foram mantidas com agitação constante, com um fluxo de ar atmosférico de 0,3 L/min, e sob iluminação constante (fotoperíodo integral, 24:0) empregando lâmpadas fluorescentes tipo Luz do Dia de 80 W numa intensidade luminosa (irradiância) de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A temperatura foi mantida em $23 \pm 2^\circ\text{C}$ com o auxílio de condicionador de ar e a salinidade empregada no meio de cultura foi de 28 partes por mil.

O pH inicial dos meios de cultura, após a esterilização, foi de $7,6 \pm 0,1$, sendo que, foram tomadas medidas deste parâmetro a cada 24 horas após o início das culturas.

4.5 FONTES DE CARBONO

Neste trabalho foi avaliado o efeito de quatro fontes de carbono nas culturas experimentais das duas espécies de microalgas. As culturas correspondentes ao controle não receberam suplementação de carbono, somente tiveram à disposição (das células microalgais) o CO₂ proveniente do ar atmosférico, empregado na aeração de todas as culturas. As demais culturas, além do CO₂ oriundo do ar atmosférico da aeração, receberam suplementação de carbono através da adição de glicose (5,0 g/L) ou acetato de sódio (0,3 g/L) ao meio de cultura, ou de dióxido de carbono (proveniente de cilindro contendo este gás) ao sistema de aeração das culturas. Nesta última, o CO₂ foi injetado continuamente ao sistema de aeração num fluxo de 1,5 mL/min, equivalente a 2% do volume de ar injetado nas unidades experimentais que receberam este tratamento.

4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

O crescimento das microalgas foi determinado pelo incremento diário da densidade celular por meio da elaboração das curvas de crescimento, avaliando-se a Densidade Celular Máxima (DCM), o Tempo de Cultivo (TEMPO) e a Velocidade de Crescimento (k), para cada espécie em cada uma das unidades experimentais.

As unidades experimentais (48) foram inoculadas com uma densidade celular de 1×10^4 cel/mL para as culturas de *T. fluviatilis* e de 10×10^4 cel/mL para as culturas de *C. muelleri*. A cada 24 horas após o início dos cultivos foram retiradas amostras das culturas a fim de determinar a densidade celular. As contagens foram realizadas em microscópio com auxílio de Câmara de Neubauer, sendo que, o número de células corresponde à média de três contagens.

4.6.1 Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento foram elaboradas com a densidade celular diária da média das três repetições de cada fonte de carbono.

Com auxílio do programa estatístico CurveExpert versão 1.3, foram ajustadas pela aproximação à curva logística conforme Pindich e Rubinfeld (1981) aplicando-se a seguinte fórmula:

$$Y = \frac{P_1}{\left[1 + \left(\frac{P_2 - N_0}{N_0} \right) \times \exp^{-kt} \right]} \quad (1)$$

onde:

Y = densidade celular.

P_1 e P_2 = primeiro e segundo parâmetros da curva logística, respectivamente.

N_0 = densidade celular inicial.

k = velocidade de crescimento (número de divisões da população por dia).

t = tempo de cultivo (em dias).

Os dados das curvas obtidas e aqueles das curvas ajustadas foram considerados correspondentes quando o coeficiente de determinação (r^2) foi igual ou superior a 0,80 (COSTA NETO, 1977).

4.6.2 Densidade Celular Máxima (DCM)

Este parâmetro foi definido como o máximo valor obtido em número de células por mililitro, antes de a cultura microalgal alcançar a fase estacionária da curva de crescimento, independentemente do tempo transcorrido desde o início do cultivo.

4.6.3 Tempo de Cultivo (TEMPO)

Este parâmetro foi determinado pelo número de dias passados desde o início do cultivo até aquele em que foi alcançada a densidade celular máxima.

4.6.4 Velocidade de Crescimento (k)

A velocidade de crescimento, a qual representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia), foi determinada através da seguinte fórmula, citada em Stein (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \text{Log} \frac{N_2}{N_1} \quad (2)$$

onde:

k = velocidade de crescimento.

3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10.

(T₂ - T₁) = intervalo de tempo em dias.

N₁ = densidade celular inicial.

N₂ = densidade celular final.

Log = logaritmo em base 10.

A velocidade de crescimento, específica de cada unidade experimental, foi determinada considerando o dia de cultivo no qual a população alcançou a densidade celular máxima.

4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA DA BIOMASSA

Para a análise bioquímica da biomassa microalgal obtida das culturas de *C. muelleri* e *T. fluviatilis* - nas fases exponencial e estacionária das curvas de crescimento e para cada uma das fontes de carbono - foram considerados a biomassa seca, o conteúdo de proteínas hidrossolúveis, de carboidratos e de lipídios. Na fração lipídica foram qualificados os ácidos graxos com número de carbonos igual ou superior a 14 e quantificados os ácidos graxos poliinsaturados.

As análises bioquímicas seguiram procedimentos específicos, desenvolvidos e/ou adaptados de outros procedimentos descritos na literatura, em se tratando do material a ser analisado (biomassa microalgal). Os procedimentos empregados estão descritos em Arredondo-Vega et al., (1997) e CIBNOR (2002).

As análises da composição bioquímica da biomassa seca foram realizadas no BIOTEC, CAL, CCA, UFSC, exceto o processo de extração dos lipídios e a análise dos ácidos graxos que foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de

Microalgas do Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste - CIBNOR, La Paz, México.

Como as espécies de microalgas empregadas neste estudo apresentam volume celular diferente, não foram comparadas as quantidades dos compostos (proteínas hidrossolúveis, carboidratos totais, lipídios totais e ácidos graxos poliinsaturados) por célula.

4.7.1 Obtenção da Biomassa Liofilizada

Após a coleta das culturas algais, nas fases específicas da curva de crescimento, procedeu-se a centrifugação, em centrífuga refrigerada (Nova Técnica, modelo 250), a 4.000 rpm e a ± 10 °C durante 20 minutos, para a separação da biomassa do meio de cultura. Este procedimento foi repetido mais duas vezes empregando uma solução de Formiato de Amônio 0,5 M (3%) segundo Zhu e Lee (1997), para a retirada do sal (NaCl) e restos do meio de cultura. A biomassa úmida foi congelada em tubos de ensaio num freezer a ± 20 °C negativos e a seguir transferida para um liofilizador (Terroni Favel, modelo LT 1000/8). Após o processo de liofilização da biomassa os tubos foram mantidos em freezer a ± 20 °C negativos até as análises.

4.7.2 Biomassa seca

Este item pode também ser descrito como biomassa seca, rendimento ou produtividade da cultura e, neste trabalho, foi expresso em miligramas de biomassa seca (liofilizada) por litro de cultura (produtividade volumétrica).

Este parâmetro foi calculado empregando a metodologia para a obtenção da biomassa liofilizada, uma vez que, o volume centrifugado era conhecido. Após o processo de liofilização a biomassa foi pesada e determinou-se a biomassa seca (liofilizada). A perda da biomassa gerada a cada centrifugação foi estimada pela medição do volume do meio de cultura separado e pela determinação da densidade celular do sobrenadante, gerando assim um fator de correção e aumentando desta forma a precisão das análises bioquímicas, conforme Lourenço (1996).

4.7.3 Proteínas Hidrossolúveis

Para a determinação de proteínas hidrossolúveis foi aplicado o método descrito por Lowry et al. (1951). As amostras contendo 5,0 mg de biomassa liofilizada foram submetidas à hidrólise alcalina com 2,0 mL de NaOH 1,0 N a ± 100 °C em Banho-Maria durante 1 hora. Após esfriar a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 30 minutos para a obtenção do extrato alcalino. Uma alíquota de 1000 μ L do extrato alcalino foi transferida para um tubo, em seguida foram adicionados 5,0 mL da Solução C*, agitando em Vortex e deixando em repouso durante 10 minutos. Após, acrescentaram-se ao tubo 500 μ L da Solução D*, misturando em Vortex e deixando repousar por 30 minutos para a realização da leitura em espectrofotômetro (SPECTRUM – Série SP2100) a 750 nm.

* Soluções:

Solução A: Na₂CO₃ a 2% em NaOH 0,1 N;

Solução B₁: CuSO₄. 5 H₂O a 0,5%;

Solução B₂: Tartarato de Sódio e Potássio a 1%;

Solução C: Soluções A, B₁ e B₂ em proporção igual a 100:1:1, respectivamente.

Solução D: Folin-Ciocalteu comercial e água destilada na proporção de 1:1.

A curva padrão foi elaborada a partir de uma solução de soro albumina fração V (BSA, Sigma) com uma concentração igual a 300 μ g/mL, realizando um gradiente de concentração de 0 até 250 μ g/mL. Os dados foram apresentados miligramas de proteínas por grama de biomassa seca.

4.7.4 Carboidratos Totais

A determinação de carboidratos totais seguiu as técnicas de Korchert (1978). Foram pesados 5 mg de amostra liofilizada submetendo à hidrólise alcalina com 2 mL de NaOH 1,0N a ± 100 °C em Banho-Maria durante 1 h. Após esfriar a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min. Realizada a extração, 500 μ L do extrato alcalino obtido foram transferidos para um tubo, adicionando em seguida 1 mL de NaOH 1N e 500 μ L de fenol a 4 %. Após trinta minutos em repouso foram acrescentados 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após esfriar a temperatura ambiente a absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro (Spectrum - Série SP 2100) a 485 nm.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de glicose anidra de concentração igual a 300 $\mu\text{g/mL}$, realizando um gradiente de concentração de 0 até 240 $\mu\text{g/mL}$. Os dados foram apresentados miligramas de carboidratos por grama de biomassa seca.

4.7.5 Lipídios Totais

A extração dos lipídios totais foi realizada conforme os procedimentos descritos por Bligh e Dyer (1959) e Nyberg (1986).

Em tubos de ensaio de vidro foram pesados 50 mg da biomassa liofilizada e extraídos os lipídios com 3 mL de uma mistura clorofórmio:metanol (1:2, v:v). A esta mistura foi adicionado 10 μL de uma solução de butil hidróxi tolueno - BHT (1% em metanol) e 5 μL de uma solução de ácido tricosanóico (23:0) como padrão interno (1 mg/mL de metanol). A seguir as amostras foram submetidas a ultrassom por três ciclos com duração de 8 min cada, em banho de água com gelo, a fim de romper as células. Todas as etapas do procedimento de extração, da determinação dos lipídios totais e dos ácidos graxos foram realizadas em ambiente com baixa intensidade luminosa, com os tubos de ensaio recobertos com folha de alumínio, visando reduzir a fotoxidação do material analisado.

Para a completa extração dos lipídios as amostras permaneceram por 24 h a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ e cobertas com papel alumínio. Após este período, as amostras foram novamente submetidas a ultrassom e centrifugadas a 4000 rpm por 20 min numa temperatura de $\pm 10^{\circ}\text{C}$. O extrato lipídico foi recuperado com pipeta Pasteur e separado em outro tubo. Foram agregados 2 mL da mistura clorofórmio:metanol aos tubos com a biomassa residual, os quais foram agitados em equipamento Vortex, novamente centrifugados, conforme descrito anteriormente, recuperando-se totalmente a fase lipídica. Aos tubos contendo o extrato lipídico foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 2 mL de água destilada, centrifugando por 10 min a 4000 rpm em 10°C para separar a fase aquosa da fase clorofórmio:lipídio. Com pipeta Pasteur foi recuperada a fase clorofórmio:lipídio (inferior) e colocada em outro tubo. Em campana de extração o clorofórmio foi evaporado e a amostra de lipídios totais foi secada com nitrogênio gasoso.

A quantificação dos lipídios totais foi realizada segundo Marsh e Weinstein (1966) pelo método gravimétrico. Os dados foram apresentados miligramas de lipídios totais por grama de biomassa seca.

4.7.6 Ácidos Graxos

A determinação dos ácidos graxos presentes na biomassa microalgal foi realizada empregando conforme os procedimentos descritos por Bligh e Dyer (1959) e Nyberg (1986).

Em tubos de ensaio de vidro o extrato de lipídios totais foi submetido a metanólise (derivatização) pela adição de 2,5 mL de uma mistura de ácido clorídrico:metanol (5%, v/v), a 85°C por 2,5 h (SATO; MURATA, 1988). Após a metilação, os metil-ésteres obtidos desta reação foram extraídos com 1,5 mL de hexano, repetindo este passo duas vezes até a total recuperação da fase hexano:metil-ésteres. O extrato de hexano foi seco com nitrogênio gasoso, resultando somente nos tubos os ácidos graxos esterificados.

Os ácidos graxos esterificados foram ressuspensos em 250 µL de hexano e colocados em um frasco de vidro com tampa de teflon, ficando as amostras armazenadas a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ negativos até as análises.

As análises para a identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes nas amostras foram realizadas em cromatógrafo de gases e espectrômetro de massa (GCD-MS, HP 1800B) equipado com uma coluna capilar Supelco Omegawax 250 (Fused Silica Capillary Column, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film thickness).

As condições de análise foram:

- volume de injeção: 1 µL;
- gás portador: He de alta pureza;
- fluxo de gás portador na coluna: 0,9 mL/min;
- injeção sem divisão de amostra (splitless);
- temperatura do injetor: 250°C;
- temperatura do detector: 260°C;
- temperatura inicial do forno: 110°C durante 3,3 min;
- Incremento: 30°C/min até 165°C. Mantendo nessa temperatura por 2 min e subindo a uma taxa de 2,2°C até 209°C permanecendo nessa temperatura por 35 min;
- método de aquisição dos espectros de massas: retardo do solvente de 6 min;

- Faixa de leitura de massas: 10 – 450 unidades de massa atômica (uma);
- Tempo entre varreduras: 0,5 min.

Os ácidos graxos presentes nas amostras foram identificados e quantificados mediante a comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massa predeterminados por 29 padrões comerciais (marca SIGMA) e seus respectivos fatores de correção, bem como, com os espectros contidos na base de espectros NIST 2002 do programa HP Mass Spectral Libraries.

Os dados foram apresentados em microgramas por miligrama de biomassa seca e em percentual relativo ao total de ácidos graxos. Também foram apresentados os dados referentes a insaturação, em percentual relativo ao total de ácidos graxos e a concentração dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) expressa em microgramas por miligrama de biomassa seca.

4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi aplicado um delineamento trifatorial 2 x 2 x 4, sendo duas espécies de microalgas (Fator 1), duas fases da curva de crescimento (Fator 2) e 4 fontes de carbono (Fator 3), totalizando 16 combinações de fatores. Foram desenvolvidos experimentos do tipo blocos completamente casualizados, com três repetições (três blocos - em três datas diferentes - contendo todas as combinações, distribuídas ao acaso), totalizando 48 unidades experimentais, conforme a Tabela 5.

TABELA 5 - Modelo do desenho experimental aplicado no estudo comparativo do crescimento e da composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* (CMU) e *Thalassiosira fluviatilis* (TFL).

Microalga	Fase da Curva	Fonte de C	Repetições (Blocos)
CMU	Exponencial	Ar (*)	3
	Estacionária	Ar	3
CMU	Exponencial	Glicose	3
	Estacionária	Glicose	3
CMU	Exponencial	Acetato	3
	Estacionária	Acetato	3
CMU	Exponencial	CO ₂	3
	Estacionária	CO ₂	3
TFL	Exponencial	Ar	3
	Estacionária	Ar	3
TFL	Exponencial	Glicose	3
	Estacionária	Glicose	3
TFL	Exponencial	Acetato	3
	Estacionária	Acetato	3
TFL	Exponencial	CO ₂	3
	Estacionária	CO ₂	3

* controle, ou seja, somente recebeu ar atmosférico sob pressão.

Para determinar o efeito das fontes de carbono (glicose, acetato ou CO₂), foram desenvolvidos experimentos aplicando-se ou não estes compostos às culturas de *C. muelleri* e *T. fluviatilis*. Para determinar o efeito da fase de crescimento na composição bioquímica microalgal foram coletadas amostras na fase exponencial e na fase estacionária da curva de crescimento.

4.8.1 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi empregado o modelo matemático proposto por Mendes (1985), para blocos completamente casualizados.

Para medir o efeito de um fator:

$$Y_{ij} = m + t_i + b_j + e_{ij} \quad (3)$$

onde:

Y_{ij} = valor observado ou variável resposta relativa à parcela que recebeu o i -ésimo tratamento e no j -ésimo bloco;

m = média geral da variável resposta;

t_i = efeito do i -ésimo tratamento (Fator 1);

b_j = efeito do j -ésimo bloco;

e_{ij} = erro aleatório associado à observação Y_{ij} .

O modelo a ser empregado para medir o efeito de dois fatores foi:

$$Y_{ij} = m + t_i + t_j + t_{ij} + b_j + e_{ij} \quad (4)$$

onde:

Y_{iJ} = valor observado ou variável resposta relativa à parcela que receber o tratamento (i), o tratamento (j), assim como a combinação dos dois fatores (ij);

m = média geral da variável resposta;

t_i = efeito do tratamento (Fator 1);

t_j = efeito do tratamento (Fator 2);

t_{ij} = efeito combinado dos Fatores 1 e 2;

b_j = efeito do j -ésimo bloco;

e_{ij} = erro experimental.

O modelo a ser empregado para medir o efeito de três fatores foi:

$$Y_{ijk} = m + t_i + t_j + t_k + t_{ijk} + b_j + e_{ijk} \quad (5)$$

onde:

Y_{iJk} = valor observado ou variável resposta relativa à parcela que receber o tratamento (i), o tratamento (j) e do tratamento (k), assim como a combinação dos três fatores (ijk);

m = média geral da variável resposta;

t_i = efeito do tratamento (Fator 1);

t_j = efeito do tratamento (Fator 2);

t_k = efeito do tratamento (Fator 3);

t_{ijk} = efeito combinado dos Fatores 1, 2 e 3;

b_j = efeito do j -ésimo bloco;

e_{ijk} = erro experimental.

Para a análise estatística dos dados foram empregados os programas, MS EXCEL 7.0, CURVEEXPERT 1.3, ASSISTAT 7.2 e STATISCA 6.0.

Os dados obtidos como resposta dos tratamentos foram submetidos ao Teste de Bartlett ($P < 0,05$) para conferir a homogeneidade das variâncias e ao Teste de Kolmogorov-Sminof ($p < 0,05$) para verificar a normalidade.

Para cada parâmetro considerado neste trabalho foi desenvolvida uma Análise de Variância (ANOVA FATORIAL) para um, dois ou três fatores. Como as repetições dos diferentes tratamentos foram conduzidas em três datas diferentes (três blocos, conforme a Tabela 5) as análises de variância foram desenvolvidas sempre considerando a análise em blocos casualizados. Isto foi realizado uma vez que, segundo Mendes (1985), há a necessidade de conferir se existiram diferenças entre os blocos, as quais poderiam causar interferência na resposta dos tratamentos e, até mesmo, gerar uma interpretação equivocada dos resultados. Por ser um experimento trifatorial e por tal necessidade de análise estatística dos blocos foi apresentado grande número de tabelas. Quando o resultado da ANOVA denotou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos, foi aplicado o teste de separação de médias de Tukey HSD ($p < 0,05$) para estabelecer as diferenças entre os tratamentos e/ou as interações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

5.1.1 Curvas de Crescimento

A determinação da densidade celular, em intervalos de 24 horas após o início das culturas, possibilitou o estabelecimento da curva de crescimento para cada unidade experimental. Nas Figuras 5 e 6 são apresentadas as curvas de crescimento, sendo que, a representação gráfica das curvas se refere à densidade celular diária (em células por mililitro) da média das três repetições para cada uma das quatro fontes de carbono. Os pontos indicam os valores obtidos e a linha contínua representa a curva ajustada, segundo regressão não linear aplicando o modelo logístico ($y = a / (1 + b \exp^{-cx})$). Conforme pode ser visualizado nas Figuras 5 e 6, o modelo empregado neste estudo foi apropriado para representar o crescimento microalgal uma vez que, segundo Olivera (1998), este é o modelo de regressão que melhor se ajusta aos dados obtidos em cultivos de microalgas (tipo estacionário).

Em cada curva são apresentados os parâmetros (a e b) da curva e o coeficiente de determinação (r^2). Observa-se que, para ambas as espécies e todas as fontes de carbono, as curvas correspondem ao modelo proposto e que os coeficientes de determinação variaram entre 0,96 e 0,99, indicando que existe correspondência entre os dados obtidos e aqueles da curva ajustada, segundo Costa Neto (1977).

Nas curvas, as setas indicam as fases exponencial e estacionária, nas quais foram retiradas as amostras para o desenvolvimento das análises bioquímicas da biomassa microalgal.

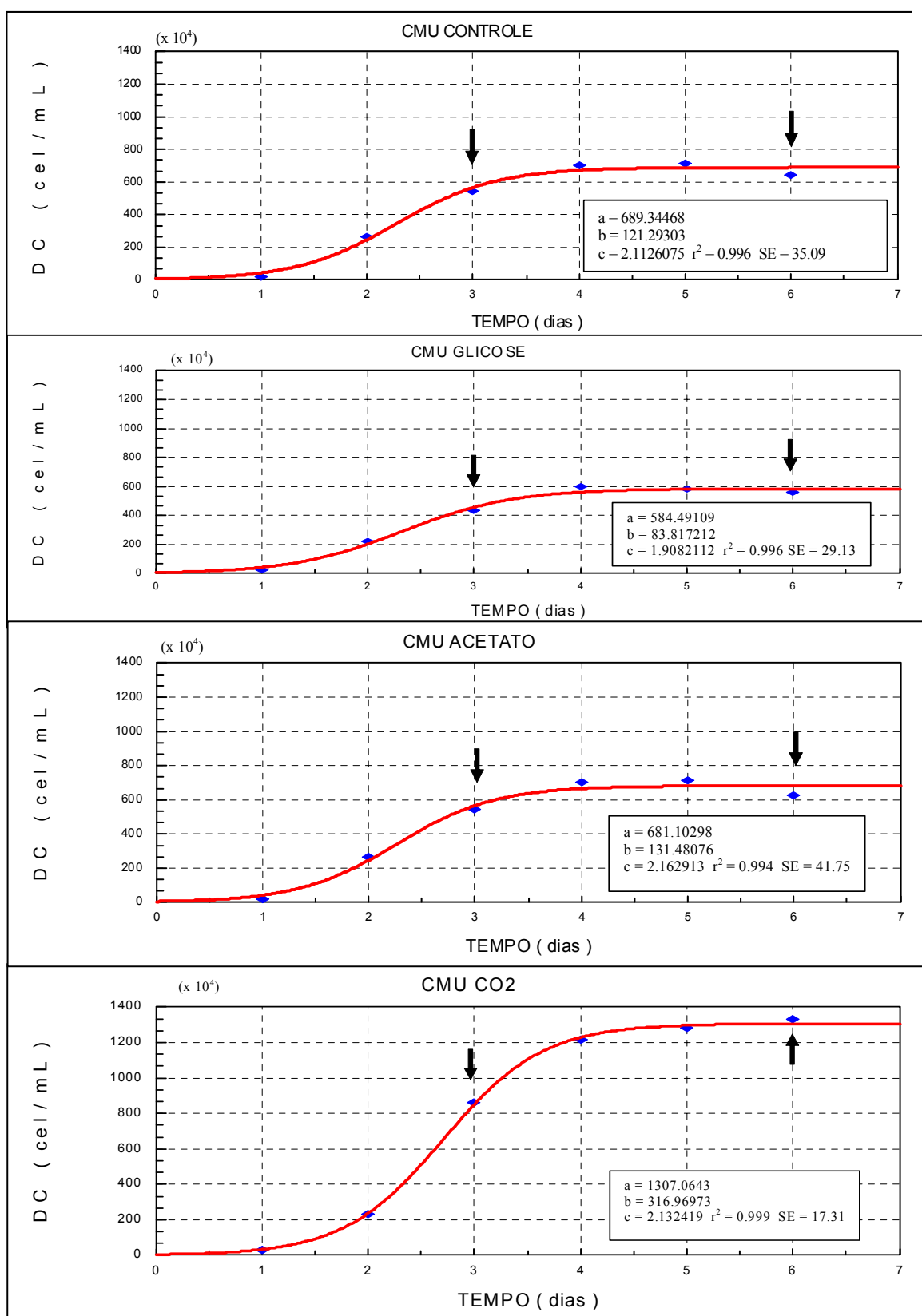


FIGURA 5 - Curvas de crescimento de *C. muelleri* (CMU) para cada fonte de carbono. Cada curva representa a média de três repetições, em número de células por mililitro. As setas indicam os pontos de amostragem para as análises bioquímicas (fases exponencial e estacionária).

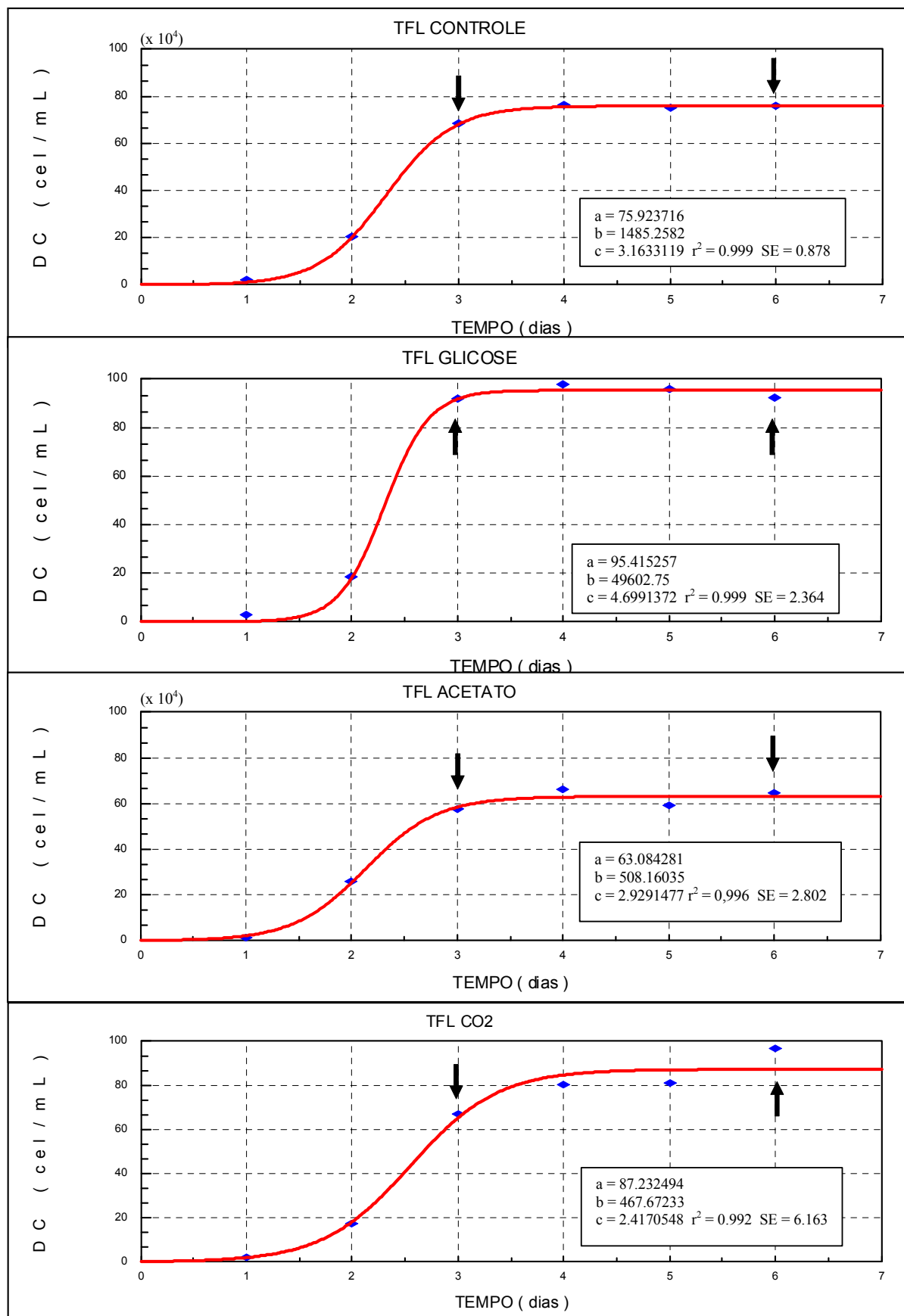


FIGURA 6 - Curvas de crescimento de *T. fluviatilis* (TFL) para cada fonte de carbono. Cada curva representa a média de três repetições, em número de células por mililitro. As setas indicam os pontos de amostragem para as análises bioquímicas (fases exponencial e estacionária).

As curvas apresentam desenho semelhante, não sendo portanto, muito perceptíveis as diferenças entre os dados obtidos nas diferentes fontes de carbono, sendo que, as possíveis diferenças entre os parâmetros de crescimento são analisadas individualmente a seguir.

5.1.2 Valores do pH

Os valores médios do pH, medido a cada 24 horas após o início dos cultivos, são apresentados nas Figuras 7 e 8.

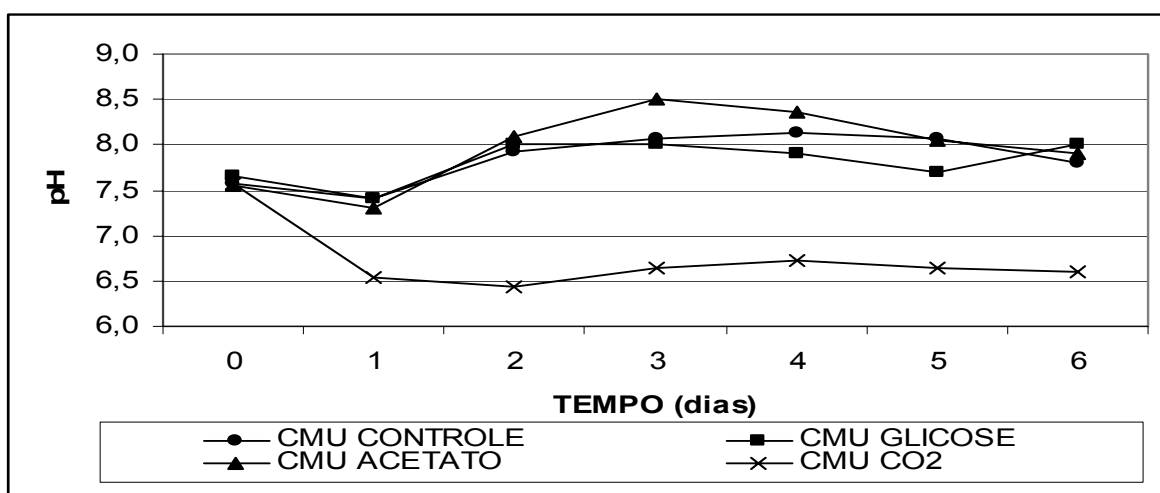


FIGURA 7 – Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas de *C. muelleri*.

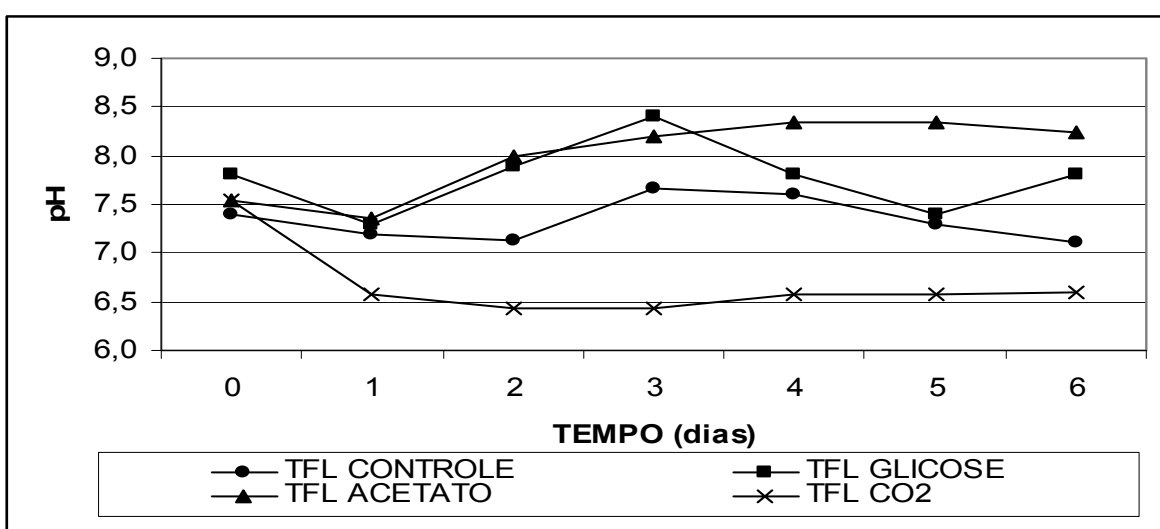


FIGURA 8 – Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas de *T. fluviatilis*.

O pH inicial das culturas apresentou um valor médio de $7,6 \pm 2,0$. As medidas do pH nas fontes Controle, Glicose e Acetato apresentaram tendência de variações discretas ao longo do desenvolvimento das culturas para ambas as espécies. Entretanto, o emprego do CO_2 gerou uma suave acidificação do meio de cultura, atingindo um valor mínimo de 6,4 e se mantendo em torno de 6,6 para ambas as espécies ao longo dos cultivos. É certo que estes valores de pH foram devidos ao próprio uso do CO_2 , o qual é um gás que apresenta pH ácido e, portanto, causou a acidificação do meio de cultura.

Segundo Esteves (1988), em meio aquoso o carbono inorgânico pode estar na forma de CO_2 , H_2CO_3 (ácido carbônico), HCO_3^- (bicarbonato) ou CO_3^{2-} (carbonato) e suas proporções dependem do pH, sendo que, conforme o aumento do pH (alcalinização) as proporções bicarbonato e carbonato aumentam no meio de cultura. Assim, numa cultura com pH ácido ocorre uma maior disponibilidade de CO_2 , sendo esta (o CO_2) a fonte de carbono preferida pelas microalgas, uma vez que este composto se difunde rapidamente (adsorção passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de fixação. Já o bicarbonato, é incorporado ativamente, gerando um gasto energético para suportar este processo (RAVEN, 1988; FALKOWSKI; RAVEN, 1990).

Segundo Boyd (1990), as concentrações (em percentual) de CO_2 , bicarbonato e carbonato são: em pH 5, de 95,7, 4,3 e 0,0; em pH 6, de 69,2, 30,8 e 0,0; em pH 7, de 18,3, 81,6 e 0,0; em pH 8, de 2,2, 97,4 e 0,5 e, em pH 9, de 0,2, 95,3 e 4,5, respectivamente.

Como neste experimento foi estudado o efeito do carbono no crescimento e na composição bioquímica da biomassa microalgal, podemos considerar muito importante essa variação do pH nas culturas com CO_2 . O emprego do CO_2 pode ter contribuído significativamente em relação ao aumento na produtividade das culturas (especialmente quanto à densidade celular máxima alcançada e quanto à biomassa obtida, parâmetros a serem discutidos a seguir) de maneiras distintas: como fonte (preferida) de carbono disponível para as células; por ter acidificado o meio de cultura, aumentando a quantidade de CO_2 disponível no meio em comparação com as demais

formas possíveis de serem encontradas na água; por disponibilização de outros nutrientes.

5.1.3 Densidade Celular Máxima (DCM)

Na Figura 9 são apresentados os valores (média das três repetições) da densidade celular máxima (DCM), calculados para cada espécie de microalga e para cada fonte de carbono.

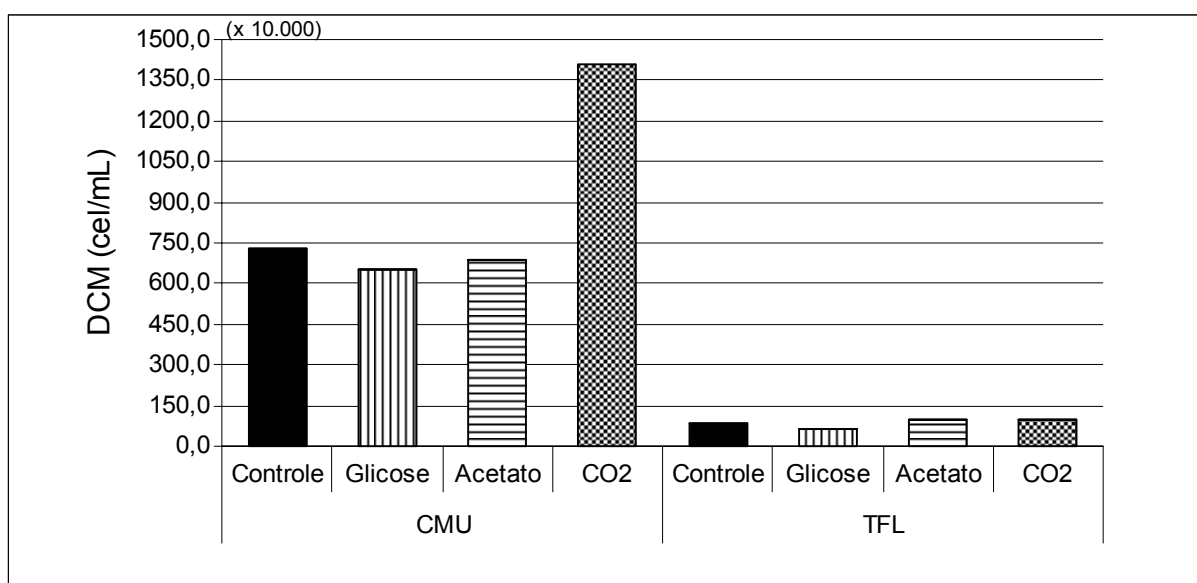


FIGURA 9 - Densidade celular máxima (DCM) para cada espécie e para cada fonte de carbono. CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

Foi evidente a diferença entre a densidade celular máxima alcançada nas culturas de *C. muelleri* (de até 1.406×10^4 ou 14.063.000 células por mililitro) e de *T. fluviatilis* (de até 104×10^4 ou 1.040.000 células por mililitro) com o emprego de CO_2 . Isto pode ser explicado pela disparidade entre as dimensões celulares das duas espécies, gerando um volume celular extraordinariamente diferente. A microalga, *T. fluviatilis* apresentou em média um volume celular de $480,66 \mu\text{m}^3$, enquanto *C. muelleri* apresentou em média um volume de $41,27 \mu\text{m}^3$ (conforme a amostragem de 50 células de cada espécie quando as culturas se encontravam em fase exponencial e 50 células de cada espécie em fase estacionária da curva de crescimento). Conforme Agusti (1991), a densidade celular alcançada nos cultivo está relacionada com o tamanho (volume) das células algais, sendo que, quanto maior o volume celular menor a densidade celular possível de ser alcançada nas culturas.

Esta variação na DCM entre as espécies além de ser natural, fez com que neste estudo não fosse proposto o desenvolvimento de análise de variância deste parâmetro de crescimento entre as espécies, a qual certamente teria apontado diferenças significativas e, estas poderiam ser erroneamente atribuídas às distintas fontes de carbono. Pelo mesmo motivo não foi comparada a densidade celular entre as fases da curva de crescimento.

A DCM obtida nas culturas de *C. muelleri* foi similar àquela verificada por Olivera (1998) em cultivos experimentais de *C. calcitrans*, enquanto que, a densidade celular máxima da espécie *T. fluviatilis* obtida neste estudo foi similar àquela obtida por Guerra, Romero e Mauri, (2004). Estes autores reportam que em cultivos sob condições controladas (luz artificial), esta microalga alcançou uma densidade celular máxima de 90×10^4 cel/ml.

Na Tabela 6 é apresentada a ANOVA unifatorial ($p < 0,05$) para a densidade celular máxima para a microalga *C. muelleri*.

TABELA 6 – Análise de variância unifatorial para a densidade celular máxima para *C. muelleri*.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F	NS
Blocos	2	46971	23486	0,5513	0,602825
Fontes de Carbono	3	1163714	387905	9,1061	0,011878*
Resíduo	6	255589	42598		
Total	11	1466274			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; NS: nível de significância; *: diferença significativa com $p < 0,05$.

Na ANOVA pode-se observar que não existiram diferenças significativas entre os dados dos blocos, entretanto houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dados referentes às fontes de carbono. Para estimar as diferenças entre as fontes de carbono foi desenvolvido o teste de comparação de médias apresentado na Tabela 7.

TABELA 7 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a densidade celular máxima (DCM) para *C. muelleri*.

Fonte de carbono	DCM*	Grupos homogêneos
CO ₂	1406,3 x 10 ⁴	a
Controle	729,7 x 10 ⁴	b
Acetato	690,0 x 10 ⁴	b
Glicose	650,0 x 10 ⁴	b

*: em células por mililitro. Diferença Mínima Significativa: 583,9 x 10⁴.

A utilização do CO₂ resultou numa DCM significativamente ($p < 0,05$) superior as demais fontes de carbono, sendo que, este efeito também foi reportado por Castro Araújo e Garcia (2005) em culturas de *Chaetoceros cf. weighamii*.

Comparando os valores do controle com aqueles empregando CO₂, presume-se que o carbono (na forma de CO₂) foi o nutriente limitante neste tipo de cultivo (CHEN, 1996), uma vez que os demais nutrientes foram adicionados às unidades experimentais em iguais concentrações e, apropriadas para suportar o máximo crescimento. Isto parece indicar que o CO₂ atmosférico, presente numa baixa concentração (controle), não foi suficiente para proporcionar um ótimo crescimento algal neste tipo de cultivo, conforme relatado por Tsuzuki et al. (1990). Ainda, existe a possibilidade de que a redução do pH possa ter favorecido a disponibilidade de algum outro nutriente, nestas condições de cultivo.

Para a espécie *C. muelleri*, o emprego do CO₂ resultou na obtenção de quase o dobro (92,7 % e significativamente diferente com $p < 0,05$) da densidade celular em relação ao controle e mais do que o dobro das demais fontes de carbono. As culturas com acetato e glicose apresentaram, mesmo sem diferença significativa do controle nem entre eles, as mais baixas densidades celulares. Este resultado parece indicar que esta espécie não apresenta a habilidade de assimilar (de maneira heterotrófica) estas fontes de carbono presentes no meio de cultura, ou que, o gasto energético para a sua assimilação não traz vantagens para as células algais. Isto já havia sido relatado por Chojnacka e Marques-Rocha (2004) e por Cerón García et al. (2005), uma vez que nem todas as espécies de microalgas conseguem assimilar carbono por outro processo que não seja através da fotossíntese (cultivo fotoautotrófico).

Como não existiram diferenças significativas entre o controle, acetato e glicose, pode-se afirmar que estas fontes de carbono também não causaram inibição do crescimento de *C. muelleri*.

Na Tabela 8 é apresentada a ANOVA unifatorial para a densidade celular máxima para *T. fluviatilis*.

TABELA 8 – Análise de variância unifatorial para a densidade celular máxima para *T. fluviatilis*.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F	NS
Blocos	2	1105,31	552,65	3,1110	0,118312
Fonte de Carbono	3	2602,95	867,65	4,8842	0,047407*
Resíduo	6	1065,87	177,64		
Total	11	4774,12			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; NS: nível de significância; *: diferença significativa com $p < 0,05$.

Na ANOVA pode-se observar que não existiram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos, entretanto houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dados referentes às fontes de carbono. Para estimar as diferenças foi desenvolvido o teste de comparação de médias apresentado na Tabela 9.

TABELA 9 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a densidade celular máxima (DCM) para *T. fluviatilis*.

Fonte de Carbono	DCM *	Grupos homogêneos
CO ₂	104,0 x 10 ⁴	a
Acetato	99,6 x 10 ⁴	a b
Controle	86,4 x 10 ⁴	a b
Glicose	66,1 x 10 ⁴	b

*: em células por mililitro. Diferença Mínima Significativa: 37,8 x 10⁴.

Semelhante aos resultados obtidos com *C. muelleri*, o emprego de CO₂ nas culturas de *T. fluviatilis* resultou numa DCM significativamente superior ($p < 0,05$), entretanto os resultados médios são semelhantes, exceto nas culturas com glicose, as quais apresentaram uma redução na ordem de 23,5 % em relação ao controle, o que pode ser considerado um efeito negativo, ou seja, limitante do crescimento.

Se considerarmos todas as culturas exceto aquelas com glicose, os valores obtidos resultaram em médias homogêneas indicando que para a espécie *T. fluviatilis* o uso do CO₂, avaliando-se somente a densidade celular máxima alcançada, não refletiu num resultado expressivo (acréscimo de 20,4 % em relação ao controle e sem diferença significativa). Como o emprego do CO₂ nos cultivos gera um acréscimo no custo de produção, pode-se supor que neste tipo de cultivo e em culturas de *T. fluviatilis* tal fonte suplementar de carbono poderia ser evitada. Entretanto, é evidente que para uma conclusão definitiva sobre o uso do CO₂ é necessário considerar a discussão de outros parâmetros de crescimento, bem como, das análises bioquímicas da biomassa microalgal.

5.1.4 Tempo de Cultivo (TEMPO)

Na Figura 10 são apresentados os valores (média das três repetições) do tempo de cultivo (TEMPO), calculados para cada espécie de microalga para cada fonte de carbono.

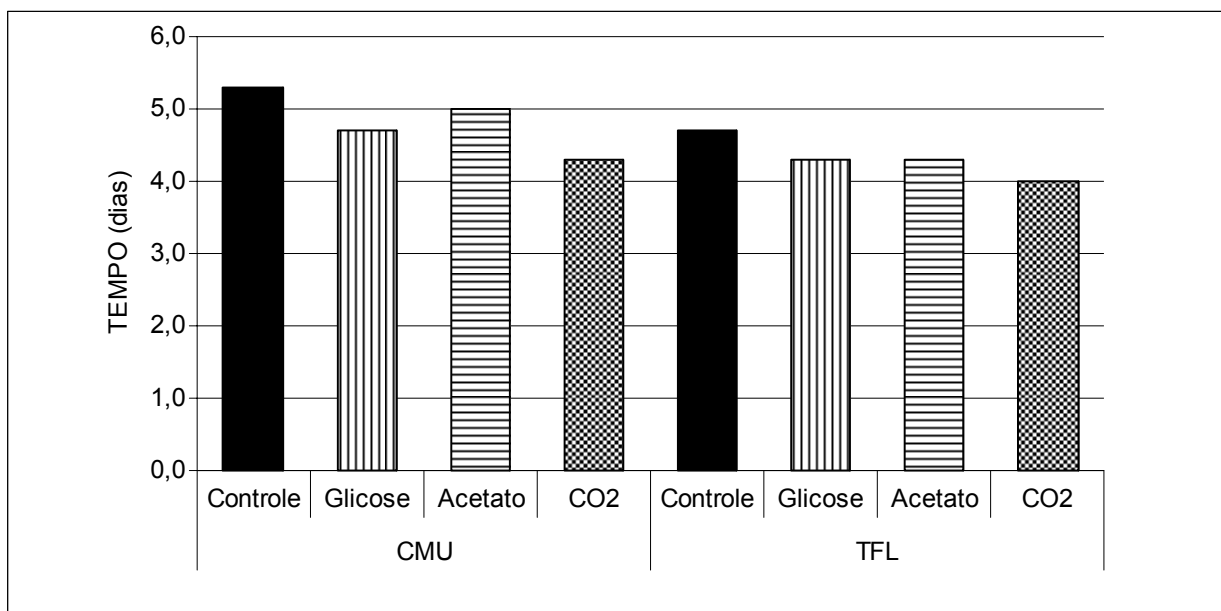


FIGURA 10 – Tempo de cultivo em dias (TEMPO), para cada espécie e para cada fonte de carbono.

Quanto ao tempo de cultivo, a espécie *C. muelleri* apresentou valor médio entre 4,3 e 5,0 dias de cultivo até alcançar a densidade celular máxima. Estes valores são semelhantes àqueles obtidos por Rousch, Bingham e Sommerfeld, (2003) em condições

de cultivo similares. Na Tabela 10 é apresentada a ANOVA unifatorial para o tempo de cultivo para *C. muelleri*.

TABELA 10 – Análise de variância unifatorial para o tempo de cultivo (TEMPO) para *C. muelleri*.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F	NS
Blocos	2	0,1667	0,0833	0,0857	0,525342
Fonte de Carbono	3	1,6667	0,5556	0,5714	0,156734
Resíduo	6	5,8333	0,9722		
Total	11	7,0000			

A ANOVA demonstrou não haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos e, apesar da variação entre as fontes de carbono apontada na Figura 10, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no TEMPO para *C. muelleri*.

Na Tabela 11 é apresentada a ANOVA unifatorial para o tempo de cultivo para *T. fluviatilis*.

TABELA 11 – Análise de variância unifatorial para o tempo de cultivo (TEMPO) para *T. fluviatilis*.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F	NS
Blocos	2	0,5000	0,2500	0,5294	0,614125
Fonte de Carbono	3	3,6667	1,2222	2,5882	0,148359
Resíduo	6	2,8333	0,4722		
Total	11	7,0000			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; NS: nível de significância; *: diferença significativa com $p < 0,05$.

Tal como para a espécie *C. muelleri*, a ANOVA demonstrou não haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos nem entre as fontes de carbono para *C. muelleri*. Da mesma forma que *C. muelleri* os valores observados estão em concordância com aqueles obtidos por Guerra, Romero e Mauri (2004).

5.2.5.1 Velocidade de Crescimento (k)

Na Figura 11 são apresentados os valores (média das três repetições) da velocidade de crescimento (k), calculados para cada espécie de microalga e para cada fonte de carbono.

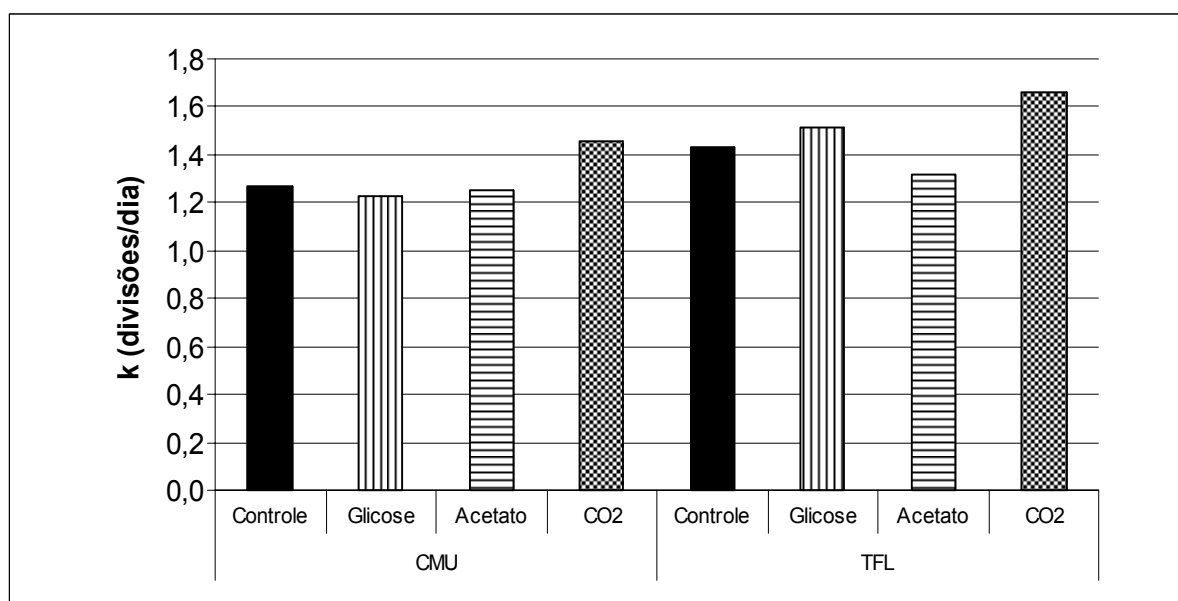


FIGURA 11 – Velocidade de crescimento (k) em divisões por dia, para cada espécie e para cada fonte de carbono.

Para a velocidade de crescimento, os maiores valores obtidos foram 1,46 divisões por dia (div/dia) e 1,66 div/dia, respectivamente para *C. muelleri* e para *T. fluviatilis*, nas culturas com CO₂. Os menores valores foram 1,23 div/dia para *C. muelleri* com glicose e 1,32 div/dia para *T. fluviatilis* com acetato.

Da mesma forma que a densidade celular máxima, a velocidade de crescimento obtida nas culturas de *C. muelleri* foi similar àquela reportada por Olivera (1998) em cultivos de *C. calcitrans*. Conforme McGinnis, Dempster e Sommerfeld, (1997), *C. muelleri* cresceu em média a uma velocidade de crescimento de 1,6 divisões por dia numa temperatura semelhante à empregada neste estudo e entrou em fase estacionária a partir do quarto dia.

As análises de variância (ANOVA com $p < 0,05$) e os testes de comparação de médias, para estes parâmetros de crescimento, são apresentados a seguir.

Na Tabela 12 é apresentada a ANOVA ($p < 0,05$) para a velocidade de crescimento para a microalga *C. muelleri*.

TABELA 12 – Análise de variância unifatorial para a velocidade de crescimento para *C. muelleri*.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F	NS
Blocos	2	0,03435	0,01717	0,2212	0,807830
Fonte de Carbono	3	0,09756	0,03252	0,04188	0,746252
Resíduo	6	0,46592	0,07765		
Total	11	0,59782			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; NS: nível de significância; *: diferença significativa com $p < 0,05$.

Na ANOVA pode-se observar que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos nem entre as fontes de carbono para este parâmetro de crescimento, ou seja, as diferentes fontes de carbono repercutiram em médias homogêneas quanto à velocidade de crescimento.

Na Tabela 13 é apresentada a ANOVA unifatorial para a velocidade de crescimento para *T. fluviatilis*.

TABELA 13 – Análise de variância unifatorial para a velocidade de crescimento para *T. fluviatilis*.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F	NS
Blocos	2	0,08847	0,04423	1,2064	0,362780
Fonte de Carbono	3	0,18323	0,06108	1,6657	0,272047
Resíduo	6	0,22000	0,03667		
Total	11	0,49169			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; NS: nível de significância; *: diferença significativa com $p < 0,05$.

Semelhante ao observado com a espécie *C. muelleri*, a ANOVA apontou que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos nem entre as fontes de carbono para a velocidade de crescimento nas culturas de *T. fluviatilis*.

Como este parâmetro de crescimento foi calculado empregando-se os dados da densidade celular máxima e aqueles do tempo de cultivo, sendo que, este último não

apresentou diferenças significativas, era de se esperar que a velocidade de crescimento também não denotasse diferença significativa entre as fontes de carbono. Este resultado é distinto daquele reportado por Banerjee et al. (2002), os quais obtiveram maior velocidade de crescimento em culturas de *Botryococcus braunii* aeradas com ar atmosférico enriquecido com CO₂ do que naquelas aeradas somente com ar atmosférico.

Um pouco distinto do resultado obtido neste trabalho em relação à densidade celular máxima alcançada, o emprego de fontes suplementares de carbono, inclusive CO₂, não causou um efeito positivo quanto ao tempo de cultivo e à velocidade de crescimento das culturas. Este resultado parece indicar que estas espécies de microalgas não podem crescer de maneira mixotrófica, ou seja, não têm a habilidade de assimilar carbono a não ser pelo processo fotossintético, visto que, se apresentassem tal habilidade o crescimento seria favorecido (LEE, 2004).

5.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS

5.2.1 Biomassa Seca

Os dados da biomassa seca (em miligramas por litro de cultura microalgal) para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono são apresentados na Figura 12.

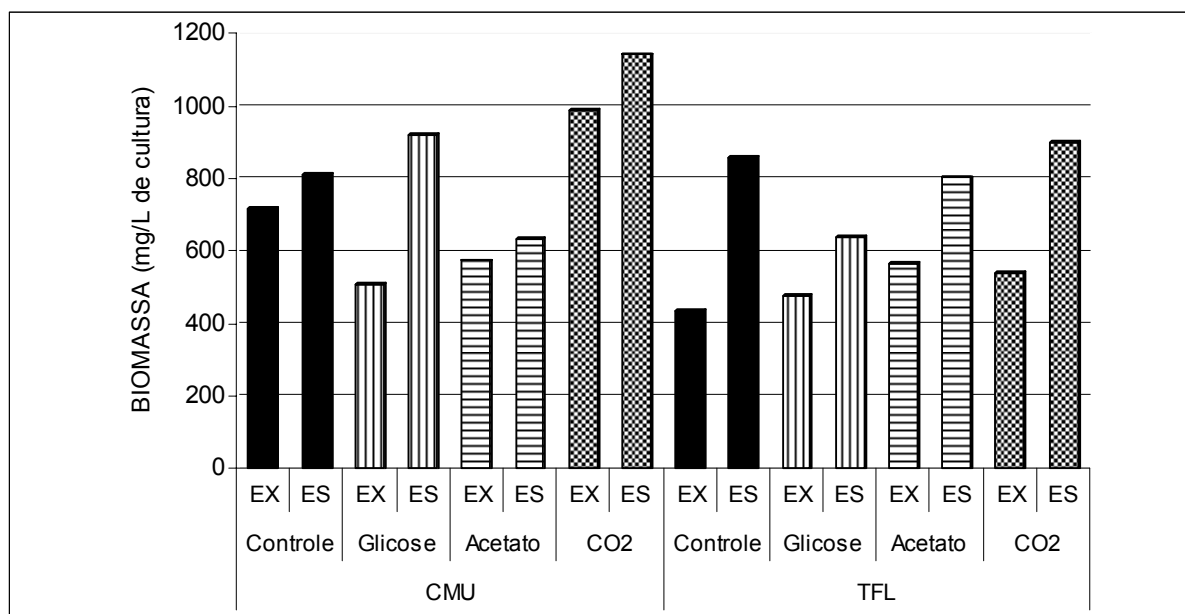


FIGURA 12 – Biomassa seca em miligramas por litro de cultura, considerando cada espécie, cada fase da curva de crescimento e cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária).

Aparentemente o emprego do CO₂ causou um aumento na biomassa nas culturas de *C. muelleri* e, de maneira geral, as culturas apresentaram maior biomassa na fase estacionária. Os dados obtidos são analisados estatisticamente na Tabela 14, na qual é apresentada a ANOVA ($p < 0,05$) para a biomassa seca.

TABELA 14 – Análise de variância fatorial para a biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	8474,30542	4237,15271	0,2287
Fator 1 (espécie)	1	218335,65187	218335,65187	11,7853**
Fator 2 (fase)	1	682133,92521	682133,92521	36,8202**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	511667,87729	170555,95910	9,2063**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	39485,47688	39485,47688	2,1313
Fator 1 x Fator 3	3	276396,50729	92132,16910	4,9731**
Fator 2 x Fator 3	3	33993,02729	11331,00910	0,6116
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	144150,53229	48050,17743	2,5936
Resíduo	30	555782,84125	18526,09471	
Total	47	2470420,14479		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Pela análise de variância pode-se observar que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos, entretanto existiram diferenças significativas ($p < 0,01$) para este parâmetro de crescimento entre as espécies, entre as fases da curva, entre as fontes de carbono e entre a interação espécie x fonte de carbono. Para estimar as diferenças foram desenvolvidos os testes de comparação de médias apresentados a seguir.

O teste de comparação de médias referente à biomassa seca entre as espécies é apresentado na Tabela 15.

TABELA 15 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a biomassa seca entre as espécies.

Espécie	Biomassa (mg/L)	Grupos homogêneos
CMU	786,7	a
TFL	651,9	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 80,3.

O Teste apontou que a microalga da espécie *C. muelleri* apresentou a maior biomassa seca por litro de cultura, sendo este valor (786,7 mg/L) superior e significativamente diferente ($p < 0,05$) daquele obtido nas culturas de *T. fluviatilis* em aproximadamente 20,7 %. Apesar da espécie *T. fluviatilis* apresentar células com maior volume, a biomassa seca obtida foi proporcional à densidade celular máxima alcançada e isso gerou uma maior produtividade nas culturas de *C. muelleri*.

Na Tabela 16 é apresentado o teste de comparação de média entre as fases da curva de crescimento.

TABELA 16 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a biomassa seca entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies.

Fase	Biomassa (mg/L)	Grupos homogêneos
Estacionária	838,5	a
Exponencial	600,1	b

Diferença Mínima significativa: 80,3.

Ao se comparar a biomassa seca entre as fases ocorreu o que era natural, a biomassa é significativamente ($p < 0,05$) maior (39,7 %) na fase estacionária da curva

de crescimento. Este resultado está de acordo com o esperado uma vez que a fase estacionária é caracterizada por apresentar uma maior densidade celular e, conseqüentemente uma maior biomassa por volume de cultura.

Na Tabela 17 é apresentado o teste de comparação de média para a biomassa seca entre as fontes de carbono.

TABELA 17 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para a biomassa seca entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies.

Fonte de carbono	Biomassa (mg/L)	Grupos homogêneos
CO ₂	891,9	a
Controle	705,4	b
Acetato	643,5	b
Glicose	636,3	b

Diferença Mínima Significativa: 150,9.

Pode-se observar que o emprego do CO₂ gerou uma biomassa significativamente ($p < 0,05$) superior as demais fontes de carbono, enquanto que, controle, glicose e acetato apresentaram médias homogêneas entre si.

Em relação ao controle, o emprego do CO₂ determinou um acréscimo de 26,4% na biomassa seca. O fato de o emprego do CO₂ resultar numa maior biomassa concorda com aquele discutido por Wen e Chen (2000a; b), os quais reportam que o carbono foi o nutriente limitante do crescimento em culturas sob condições fototróficas de *Nitzschia laevis* e que, o emprego desta fonte de carbono implicou numa maior biomassa nas culturas.

A biomassa seca obtida com o emprego do acetato foi semelhante àquela obtida por Cerón García et al. (2005) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum*, entretanto, foi menor do que os valores reportados por estes autores nas culturas desta espécie com o emprego de glicose.

Mesmo tendo sido percebido este resultado positivo com o emprego do CO₂ para ambas as espécies, ao compará-las individualmente na fase estacionária (vide a Figura 10 e a Tabela 2 do ANEXO 1), verificou-se uma grande diferença indicando que a biomassa seca de *C. muelleri* teve um aumento de 40,7 %, enquanto que em *T.*

fluviatilis o emprego desta fonte representou um aumento de somente 4,8 % em relação ao controle.

O teste de comparação de médias referente à biomassa seca da interação entre espécie e fonte de carbono é apresentado na Tabela 18.

TABELA 18 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para biomassa seca da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	Biomassa (mg/L)	Grupos homogêneos
CMU x CO ₂	1065,1	a
CMU x Controle	763,9	b
TFL x CO ₂	718,9	b
CMU x Glicose	715,0	b
TFL x Acetato	684,8	b
TFL x Controle	646,8	b
CMU x Acetato	602,9	b
TFL x Glicose	557,7	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 186,9.

Observa-se que a interação CMU x CO₂ apresentou a maior biomassa, com 1065,1 mg/L de cultura, denotando diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com as demais interações e, aproximadamente 39,4 % superior àquela obtida no controle para a mesma espécie. Pode-se observar também que, a interação TFL x Glicose apontou no Teste a menor média, com 557,7 mg/L de cultura, entretanto, apresentou média significativamente homogênea com aquelas obtidas nas demais interações. Mesmo apresentando uma pequena diferença, o emprego do CO₂ no cultivo de *T. fluviatilis* gerou uma biomassa maior (11,1 %) do que aquela obtida no controle.

Ficou evidente o efeito positivo que o emprego do CO₂ proporcionou à biomassa da espécie *C. muelleri*. Isto, mais uma vez indica que o uso do CO₂ foi muito mais importante em *C. muelleri* do que em *T. fluviatilis* em se tratando da obtenção da maior biomassa nas culturas microalgais. Igualmente, Castro Araújo e Garcia (2005), verificaram maior biomassa em cultivos da microalga *C. cf. weighamii* com o emprego de aeração enriquecida com CO₂.

Mesmo sem diferença significativa em relação ao controle, o emprego do acetato e da glicose resultou numa menor biomassa. Entretanto, era esperado um resultado diferente, ou seja, que a densidade celular e a biomassa fossem maiores nas culturas com estas fontes suplementares de carbono orgânico (cultivo mixotrófico), uma vez que, acetato e glicose são os substratos orgânicos mais empregados em culturas mixotróficas de espécies microalgais de interesse econômico (CHEN, 1996; YANG; HUA; SHIMIZU, 2000). Este resultado difere daquele apresentado por Chen, Chen e GONG (1997), os quais verificaram que o emprego de acetato proporcionou um aumento no crescimento de *Haematococcus lacustris*, bem como é distinto daqueles resultados apresentados por Tripathi et al. (1999) em culturas de *Haematococcus pluvialis* e, por Kitano, Matsukawa e Karube (1997), em culturas de *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* e *Nitzschia* sp., espécies potencialmente produtoras de ácidos graxos poliinsaturados.

Segundo Cerón García et al. (2005) como a glicose é o produto final da fotossíntese poderia ser assumido que qualquer microrganismo fotossintético teria condições de incorporar este composto diretamente no seu metabolismo. Estes autores reportam que o crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* foi favorecido com o emprego de glicose numa concentração de 5,0 g/L, a mesma empregada neste trabalho.

Segundo Lee et al. (1996) e Lee (2004), apesar de muitas espécies algais apresentarem baixa afinidade por substratos orgânicos, e conseqüentemente baixa produtividade, a taxa de crescimento em cultivo do tipo mixotrófico é o resultado aproximado da soma da taxa verificada em condições fotoautotróficas com a taxa de crescimento em condições heterotróficas. Desta forma, nas culturas com glicose e acetato (cultivo mixotrófico) era esperada uma maior taxa de crescimento (ou densidade celular máxima ou biomassa), quando comparados com o controle (cultivo fotoautotrófico). Isto parece indicar que, estas duas fontes suplementares de carbono não foram assimiladas por ambas as espécies para o aumento da biomassa, uma vez que nem todas as microalgas podem assimilar outra fonte de carbono além do CO₂ através do processo fotossintético (CHOJNACKA; MARQUES-ROCHA, 2004).

A baixa produtividade pode também ser atribuída ao fato do CO₂ ser absorvido por difusão simples (transporte passivo), por ser neutro e a molécula pequena, enquanto a glicose e o acetato são moléculas grandes, havendo dispêndio energético para a absorção destes compostos pela célula (TAIZ; ZEIGER, 2004).

5.2.2 Proteínas Hidrossolúveis

Na Figura 13 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada fonte de carbono quanto ao teor de proteínas hidrossolúveis, em miligramas por grama (mg/g), da biomassa liofilizada.

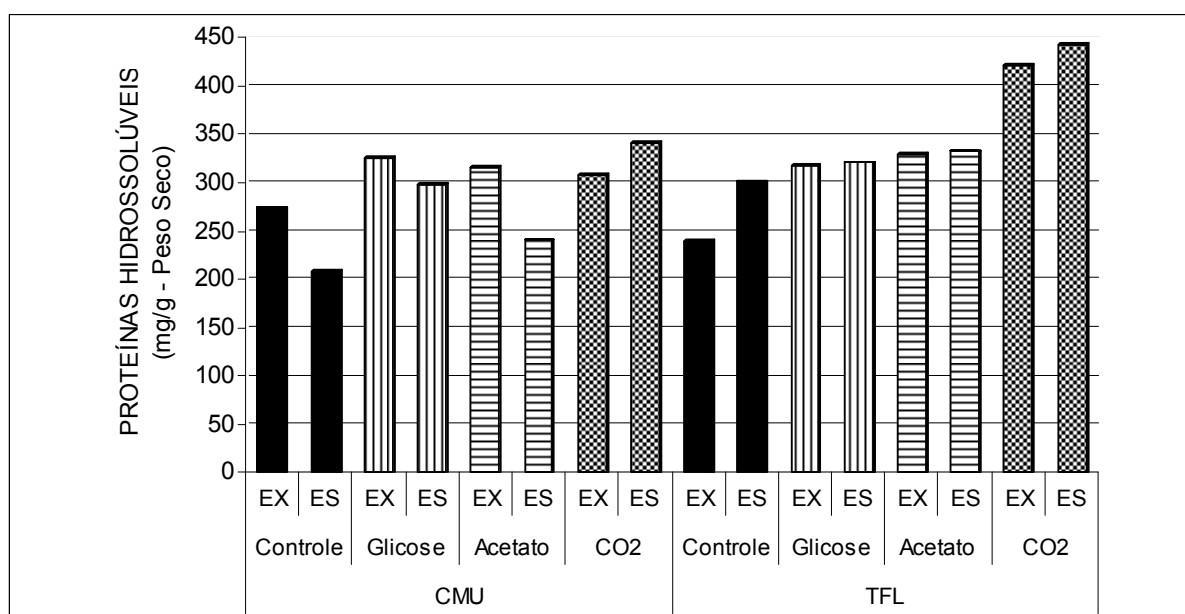


FIGURA 13 – Proteínas hidrossolúveis em miligramas por grama da biomassa seca, considerando cada espécie, cada fase da curva de crescimento e cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária).

Aparentemente a utilização do CO₂ causou um aumento no conteúdo de proteínas, especialmente culturas de *T. fluviatilis*. Os dados obtidos são analisados estatisticamente a seguir. Na Tabela 19 é apresentada a ANOVA ($p < 0,05$) para o teor de proteínas hidrossolúveis.

TABELA 19 – Análise de variância fatorial para proteínas hidrossolúveis.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	797,34042	398,67021	0,2691
Fator 1 (espécie)	1	29008,33333	29008,33333	19,5810**
Fator 2 (fase)	1	369,63000	369,63000	0,2495
Fator 3 (fonte de carbono)	3	91600,97417	30533,65806	20,6106**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	9424,80750	9424,80750	6,3619*
Fator 1 x Fator 3	3	16870,69500	5623,56500	3,7960*
Fator 2 x Fator 3	3	6272,51833	2090,83944	1,4113
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	8265,12083	2755,04028	1,8597
Resíduo	30	44443,65958	1481,45532	
Total	47	207053,07917		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; ** diferença significativa com $p < 0,01$.

Pode-se observar que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos, entretanto houve diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as espécies e entre as fontes de carbono. Da mesma forma, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na interação entre espécie e fase da curva e na interação espécie x fonte de carbono.

Apesar da ANOVA apontar que não existiram diferenças significativas entre as fases da curva de crescimento, é possível observar na Figura 13 que para a espécie *C. muelleri* o teor de proteínas decresceu na fase estacionária exceto nas culturas com CO₂, enquanto foi maior do que o controle em todas as fontes de carbono para *T. fluviatilis*.

Na Tabela 20 é apresentado o teste de comparação de médias referente ao conteúdo de proteínas hidrossolúveis entre as espécies.

TABELA 20 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	Proteínas (mg/g)	Grupos homogêneos
TFL	338,2	a
CMU	289,0	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 22,7.

Conforme o resultado do Teste a espécie *T. fluviatilis* apresentou maior conteúdo de proteínas hidrossolúveis, com 338,2 miligramas de proteínas por grama da biomassa seca, denotando diferença significativa ($P < 0,05$) do valor obtido com *C. muelleri*.

A concentração de proteínas hidrossolúveis verificada nas culturas de *C. muelleri* (33,8 %) foi similar àquela obtida por Olivera (1998) em culturas de *C. calcitrans* (30,1 %). Entretanto foi inferior ao valor obtido por Renaud et al. (2002), os quais reportaram que em culturas de *Chaetoceros* sp. a concentração de proteínas alcançou uma concentração de 57,3 % da biomassa seca.

A espécie *T. fluviatilis* apresentou maior conteúdo de proteínas na biomassa seca do que *C. muelleri*, sendo que este resultado confere com aquele obtido por Leal, Diaz e Garcia, (1990).

Na Tabela 21 é apresentado o teste de comparação de médias referente ao conteúdo de proteínas hidrossolúveis entre as fontes de carbono.

TABELA 21 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies.

Fonte de carbono	Proteínas (mg/g)	Grupos homogêneos
CO ₂	378,4	a
Glicose	315,6	b
Acetato	304,7	b
Controle	255,7	c

Diferença Mínima Significativa: 32,1.

A fonte de carbono causou diferença significativa ($p < 0,05$) no conteúdo de proteínas hidrossolúveis e, mais uma vez, o emprego do CO_2 causou um acréscimo significativamente diferente ($p < 0,05$). Em comparação com o controle, o emprego do CO_2 causou um incremento de aproximadamente 48,0% no conteúdo de proteínas. Este resultado parece indicar que se o intuito é a obtenção de biomassa com elevado teor protéico é indispensável o uso desta fonte suplementar de carbono neste tipo de cultivo.

O emprego de glicose e de acetato igualmente gerou um aumento no teor de proteínas hidrossolúveis de 23,4 % e de 19,2 %, respectivamente, em comparação com aquele obtido no controle. Esta comparação parece indicar que ambas as espécies valeram-se de alguma maneira destas fontes suplementares de carbono para incrementar o conteúdo de proteínas na biomassa, visto que, quando uma quantidade suficiente de nutrientes está disponível no meio são principalmente sintetizadas proteínas pelas células algais (SUSENIK; WARHON, 1991).

Na Tabela 22 é apresentado o teste de comparação de médias referente ao conteúdo de proteínas hidrossolúveis da interação entre as espécies e as fases da curva de crescimento.

TABELA 22 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento, considerando ambas as espécies.

Interação	Proteínas (mg/g)	Grupos homogêneos	
TFL x Estacionária	349,4	a	
TFL x Exponencial	326,9	a	b
CMU x Exponencial	305,7	b	c
CMU x Estacionária	272,2	c	

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 32,1.

A interação TFL x Estacionária, apresentou um conteúdo de proteínas hidrossolúveis (349,4 mg/g) significativamente superior ($p < 0,05$) às interações CMU x Exponencial e CMU x Estacionária. Pode-se observar também que a espécie *T. fluviatilis* não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na interação com a fase da curva de crescimento. As interações TFL x Exponencial e CMU x Exponencial não

apresentaram diferenças significativas. A espécie CMU também não apresentou diferença significativa na interação com a fase da curva de crescimento. A interação CMU x Estacionária apresentou significativamente o menor conteúdo de proteínas hidrossolúveis, com 272,2 miligramas de proteínas por grama da biomassa seca.

Na Tabela 23 é apresentado o teste de comparação de médias referente ao conteúdo de proteínas hidrossolúveis da interação entre as espécies e as fontes de carbono.

TABELA 23 – Teste de comparação de médias (Tukey com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	Proteínas (mg/g)	Grupos homogêneos
TFL x CO ₂	432,3	a
TFL x Acetato	330,9	b
CMU x CO ₂	324,4	b
TFL x Glicose	319,0	b
CMU x Glicose	312,0	b
CMU x Acetato	278,4	b c
TFL x Controle	270,3	b c
CMU x Controle	241,0	c

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 45,3.

Como já havia sido denotada diferença individual entre as espécies e entre as fontes de carbono, a interação entre estes fatores também apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). Observa-se que a interação TFL x CO₂ apresentou o maior valor, com 432,3 mg/g de proteínas, o qual é 60,0 % superior àquele obtido na interação TFL x Controle e na comparação da interação CMU x Controle com CMU x CO₂, esta última causou um acréscimo de 34,6% no teor de proteínas. Da mesma forma, a interação CMU x Controle apontou no Teste a menor média observada, com diferenças significativas entre as demais interações. Todas as demais interações apresentaram médias significativamente homogêneas. Como para ambas as espécies as menores médias foram obtidas no controle, isto reforça o conceito de que a síntese proteica foi favorecida com o emprego das fontes suplementares de carbono.

5.2.3 Carboidratos Totais

Na Figura 14 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada fonte de carbono quanto ao teor de carboidratos totais, em miligramas por grama (mg/g), da biomassa liofilizada.

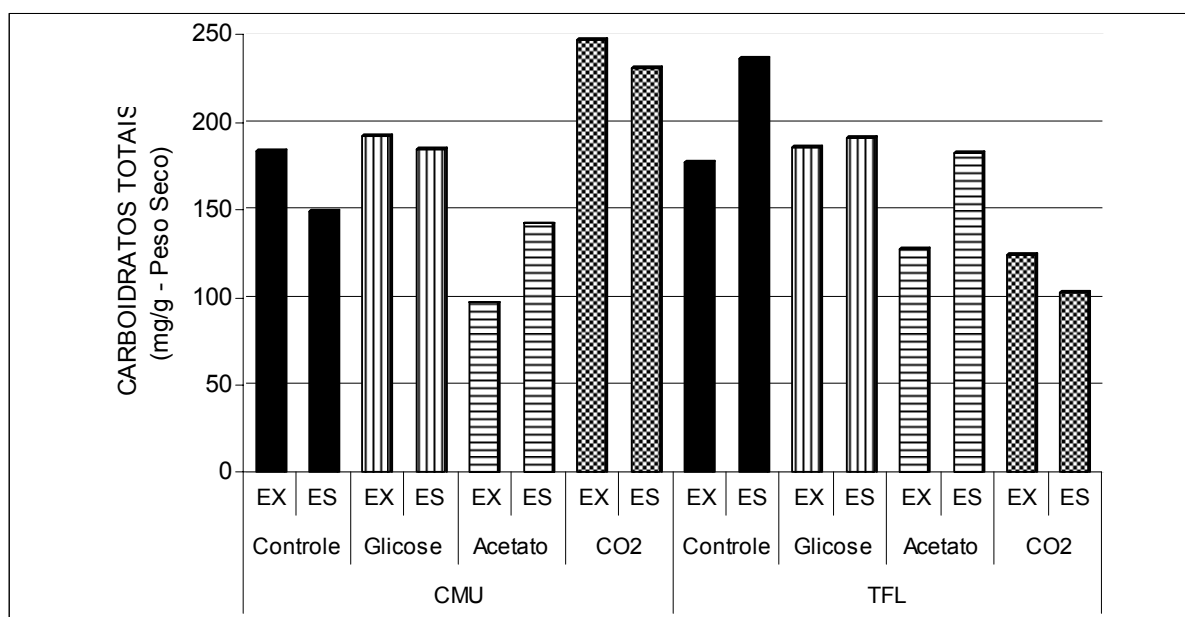


FIGURA 14 – Carboidratos totais em miligramas por grama da biomassa seca, considerando cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária).

De maneira geral não foi possível inferir muito acerca dos dados apresentados. Para determinar as diferenças quanto ao teor de carboidratos na biomassa seca foi desenvolvida a ANOVA ($p < 0,05$), apresentada Tabela 24.

TABELA 24 – Análise de variância fatorial para carboidratos totais.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	894,53805	447,26903	1,2147
Fator 1 (espécie)	1	1866,75908	1866,75908	5,0699*
Fator 2 (fase)	1	1353,20041	1353,20041	3,6751
Fator 3 (fonte de carbono)	3	20612,95094	6870,98365	18,6608**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	2297,71687	2297,71687	6,2403*
Fator 1 x Fator 3	3	54256,7174	18085,57235	49,1184**
Fator 2 x Fator 3	3	7628,98717	2542,99572	6,9065**
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	4557,74468	1519,24823	4,1261*
Resíduo	30	11046,10768	368,20359	
Total	47	104514,72193		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; ** diferença significativa com $p < 0,01$.

Pode-se observar que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos, porém houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as espécies, entre as interações espécie x fase da curva e entre a interação espécie x fase da curva x fonte de carbono. Houve também diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as fontes de carbono e entre as interações espécie x fonte de carbono e fase da curva x fonte de carbono. Para evidenciar as diferenças foram desenvolvidos os testes de comparação de médias apresentados a seguir. Na Tabela 25 é apresentado o teste de comparação de média entre as espécies.

TABELA 25 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	Carboidratos (mg/g)	Grupos homogêneos
CMU	178,5	a
TFL	166,1	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 11,3.

O Teste demonstrou a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) no conteúdo de carboidratos entre as espécies, sendo que o maior valor foi obtido com *C. muelleri*, com 178,5 mg de carboidratos por grama de biomassa seca e, apesar deste

resultado, a diferença (7,5 %) entre as médias pode ser considerada muito pequena. A concentração de carboidratos verificada nas culturas de *C. muelleri* (17,8 %) foi um pouco superior àquela obtida por Olivera (1998) em culturas de *C. calcitrans* (14,8 %) e por Renaud et al. (2002) com 13,1 % em culturas de *Chaetoceros* sp. Na Tabela 26 é apresentado o teste de comparação de média entre as fontes de carbono.

TABELA 26 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies.

Fonte de carbono	Carboidratos (mg/g)	Grupos homogêneos
Glicose	188,6	a
Controle	186,7	a
CO ₂	176,5	a
Acetato	137,3	b

Diferença Mínima Significativa: 16,0.

Na comparação entre as fontes de carbono, o emprego de glicose e de CO₂ não mostrou qualquer efeito na síntese de carboidratos em relação ao controle. Somente o com o emprego do acetato foi verificada uma redução de 36,0 % em relação ao controle (diferença significativa com $p < 0,05$), indicando que o emprego dessa fonte suplementar de carbono reduziu a síntese de carboidratos. Este resultado difere daquele obtido por Castro Araújo e Garcia (2005), uma vez que segundo estes autores, a concentração de carboidratos foi menor com o emprego do CO₂ nas culturas de *C. cf. weighamii*, bem como difere daquele reportado por Ishida et al. (2000) no qual o emprego do CO₂ causou um aumento no conteúdo de carboidratos na biomassa de *T. fluviatilis*.

Na Tabela 27 é apresentado o teste de comparação de médias para carboidratos totais da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

TABELA 27 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

Interação	Proteínas (mg/g)	Grupos homogêneos
CMU x Exponencial	180,1	a
TFL x Estacionária	178,2	a
CMU x Estacionária	176,9	a
TFL x Exponencial	153,8	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 15,9.

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as interações CMU x Exponencial, TFL x Estacionária e CMU x Estacionária. A interação TFL x Exponencial resultou no menor valor observado (153,8 mg/g) quando ao teor de carboidratos, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação com as demais interações.

Na Tabela 28 é apresentado o teste de comparação de médias para carboidratos totais da interação entre espécie e fonte de carbono.

TABELA 28 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	Carboidratos (mg/g)	Grupos homogêneos
CMU x CO ₂	239,3	a
TFL x Controle	206,9	a b
CMU x Glicose	188,7	b c
TFL x Glicose	188,6	b c
CMU x Controle	166,5	c
TFL x Acetato	155,0	c d
CMU x Acetato	119,5	d e
TFL x CO ₂	113,6	e

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 22,6.

A interação CMU x CO₂ resultou no maior valor do conteúdo de carboidratos, com diferenças significativas ($p < 0,05$). O emprego do CO₂ nos cultivos de *C. muelleri* gerou um acréscimo de 69,6 % no conteúdo de carboidratos em relação ao Controle,

indicando ser o CO₂ uma excelente fonte de carbono quando se trata de potencializar a síntese de carboidratos em cultivos desta espécie de microalga. Este resultado mostrou-se bastante distinto, uma vez que a biomassa obtida na interação TFL x CO₂ apresentou o menor conteúdo de carboidratos e, nas análises anteriores isto não havia sido percebido. Em relação à interação TFL x Controle, a interação TFL x CO₂ resultou numa redução na ordem de 82,1% no conteúdo de carboidratos. As interações espécie x Acetato também apresentaram teores reduzidos de carboidratos, indicando que para obtenção de um elevado conteúdo de carboidratos, no cultivo desta espécie o emprego de CO₂ ou de acetato não é recomendado.

O fato da interação CMU x CO₂ apresentar o maior conteúdo de carboidratos e a interação TFL x CO₂ o menor conteúdo, parece indicar que as culturas (destas duas interações) se encontravam em situações ambientais (fisiológicas) distintas. A primeira deveria se encontrar em condições ainda satisfatórias para o crescimento, enquanto a segunda, poderia estar com alguma limitação do crescimento, uma vez que os carboidratos são geralmente sintetizados enquanto existe quantidade suficiente de nutrientes no meio (YONGMANITCHAI; WARD, 1991).

Na Tabela 29 é apresentado o teste de comparação de médias para carboidratos totais da interação entre a fase da curva de crescimento e o fonte de carbono.

TABELA 29 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre fase da curva de crescimento e fonte de carbono.

Interação	Carboidratos (mg/g)	Grupos homogêneos
Exponencial x CO ₂	193,0	a
Exponencial x Controle	189,1	a
Exponencial x Glicose	188,1	a
Estacionária x Glicose	185,9	a
Estacionária x Controle	180,4	a
Exponencial x Acetato	167,0	a
Estacionária x Acetato	162,1	a
Estacionária x CO ₂	112,4	b

Diferença Mínima Significativa: 22,6.

O conteúdo de carboidratos na biomassa foi praticamente o mesmo em todas as interações fase x fonte de carbono, somente a interação Estacionária x CO₂ apresentou um valor significativamente diferente ($p < 0,05$) e inferior as demais. Este resultado indica que além do teor de carboidratos não ter apresentado variação entre as fases exponencial e estacionária também não gerou resultados distintos na interação com qualquer fonte de carbono.

O teste de comparação de médias para carboidratos totais das interações entre a espécie, a fase da curva de crescimento e a fonte de carbono, são apresentados na Tabela 30.

TABELA 30 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie, fase da curva de crescimento e fonte de carbono.

Interação	Carboidratos (mg/g)	Grupos homogêneos
CMU x Exponencial x CO ₂	247,6	a
TFL x Estacionária x Controle	236,8	a b
CMU x Estacionária x CO ₂	231,2	a b c
CMU x Exponencial x Glicose	192,3	a b c d
TFL x Estacionária x Glicose	191,2	a b c d
TFL x Exponencial x Glicose	186,0	b c d e
CMU x Estacionária x Glicose	185,1	b c d e
CMU x Exponencial x Controle	183,8	b c d e
TFL x Estacionária x Acetato	182,2	b c d e f
TFL x Exponencial x Controle	177,1	c d e f
CMU x Estacionária x Controle	149,3	d e f g
CMU x Estacionária x Acetato	142,2	d e f g
TFL x Exponencial x Acetato	127,9	e f g
TFL x Exponencial x CO ₂	124,3	f g
TFL x Estacionária x CO ₂	103,0	g
CMU x Exponencial x Acetato	96,9	g

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 22,1.

Conforme o Teste, a interação CMU x Exponencial x CO₂ resultou no maior conteúdo de carboidratos, confirmando os resultados discutidos nos parágrafos

anteriores. Entretanto, este valor não é significativamente diferente daquele verificado em algumas das outras interações, porém é diferente e 34,7 % superior ao obtido na combinação CMU x Exponencial x Controle. Comparando as interações empregando as outras fontes de carbono, pode-se considerar que o emprego do CO₂ apresentou um acréscimo no teor de carboidratos para *C. muelleri*, independentemente da fase da curva de crescimento. Fato este que ocorreu justamente ao contrário para a espécie *T. fluviatilis*, com a qual o emprego desta fonte suplementar de carbono repercutiu negativamente no conteúdo de carboidratos em relação ao controle.

Pelo anteriormente discutido ficou evidente que objetivando alcançar um elevado teor de carboidratos na biomassa destas espécies, o emprego de CO₂ gerou um resultado positivo na biomassa de *C. muelleri* enquanto seu efeito foi notadamente negativo na biomassa de *T. fluviatilis*.

5.2.4 Lipídios Totais

Na Figura 15 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada fonte de carbono quanto ao teor de lipídios totais, em miligramas por grama (mg/g), da biomassa liofilizada.

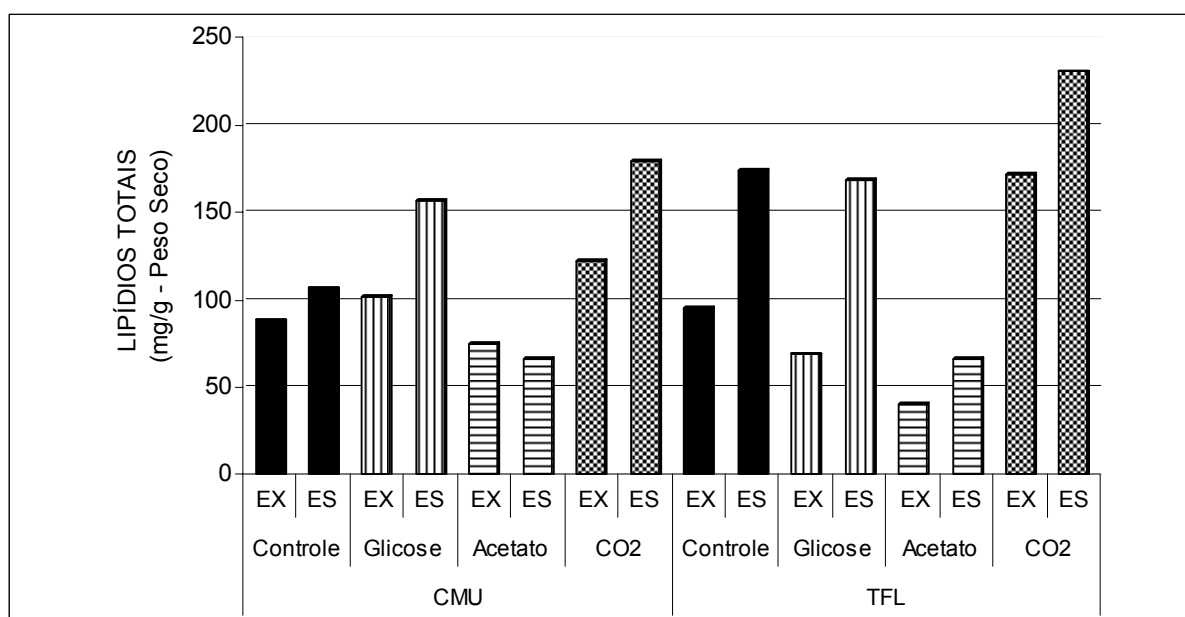


FIGURA 15 – Lipídios totais em miligramas por grama da biomassa seca, considerando cada espécie, cada fase da curva de crescimento e cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária).

Aparentemente o emprego do CO₂ causou um aumento no conteúdo de lipídios, especialmente culturas de *T. fluviatilis*. Nitidamente o emprego de acetato causou uma redução no conteúdo de lipídios. Praticamente em todas as fontes, o conteúdo de lipídios totais foi maior na fase estacionária da curva de crescimento. Os dados obtidos são analisados a seguir. Na Tabela 31 é apresentada a ANOVA ($p < 0,05$) para o teor de lipídios totais.

TABELA 31 – Análise de variância fatorial para lipídios totais.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	2495,04520	1247,52260	2,3870
Fator 1 (espécie)	1	2678,14441	2678,14441	5,1244*
Fator 2 (fase)	1	27839,37001	27839,37001	53,2685**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	78456,77124	26152,25708	50,0403**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	3825,25521	3825,25521	7,3193*
Fator 1 x Fator 3	3	10072,33747	3357,44582	6,4242**
Fator 2 x Fator 3	3	7466,77068	2488,92356	4,7624**
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	1360,70604	453,56868	0,8679
Resíduo	30	15678,71293	522,62376	
Total	47	149873,11319		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; ** diferença significativa com $p < 0,01$.

Pode-se observar que não existiram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos. Observa-se também que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as espécies e entre as interações espécie x fase da curva. Houve também interações significativas ($p < 0,01$) entre as fases da curva, as fontes de carbono, as interações espécie x fonte de carbono e fase da curva x fonte de carbono. Para evidenciar as diferenças foram desenvolvidos os testes de comparação de médias apresentados a seguir. Na Tabela 32 é apresentado o teste de comparação de média entre as espécies.

TABELA 32 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	Lipídios (mg/g)	Grupos homogêneos
TFL	126,9	a
CMU	112,0	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 13,5.

A espécie *T. fluviatilis* apresentou um conteúdo de lipídios totais na ordem de 13,3 % superior ao obtido com *C. muelleri* (significativamente diferente com $p < 0,05$). Este resultado concorda com aquele reportado por Leal, Diaz e Garcia, (1990) na comparação entre estas duas espécies de microalgas. Já, a concentração de lipídios verificada nas culturas de *C. muelleri* (11,2 %) neste trabalho foi um pouco inferior àquela obtida por Olivera (1998) em culturas de *C. calcitrans* (16,8 %) e por Renaud et al. (2002) com 17,4 % de lipídios na biomassa obtida de culturas de *Chaetoceros* sp.

Na Tabela 33 é apresentado o teste de comparação de média entre as fases da curva de crescimento.

TABELA 33 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies.

Fase	Lipídios (mg/g)	Grupos homogêneos
Estacionária	143,5	a
Exponencial	95,4	b

Diferença Mínima Significativa: 13,5.

O conteúdo de lipídios totais apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com um teor superior na fase estacionária. Isto parece indicar que a síntese e a acumulação desta classe de compostos ocorreu nesta fase, este resultado concorda com aquele reportado por McGinnis, Dempster e Sommerfeld (1997), onde a maior concentração de lipídios foi igualmente verificada na fase estacionária em culturas de *C. muelleri*.

Segundo Dunstan et al. (1993) a biomassa microalgal é rica em lipídios polares na fase exponencial e acumula triacilgliceróis (reserva) na fase estacionária e, segundo Yongmanitchai e Ward (1991), as microalgas tendem a estocar sua fonte energética na forma de lipídios conforme a cultura vai se tornando mais velha.

O teste de comparação de média entre as fontes de carbono é apresentado na Tabela 34.

TABELA 34 – Teste de comparação de médias (Tukey com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies.

Fonte de carbono	Lipídios (mg/g)	Grupos homogêneos
CO ₂	176,0	a
Glicose	123,9	b
Controle	115,9	b
Acetato	61,9	c

Diferença Mínima Significativa: 25,3.

O emprego do CO₂ gerou um maior conteúdo de lipídios totais na biomassa seca, com diferença significativa ($p < 0,05$) das demais fontes de carbono, sendo 51,9 % superior ao controle. Segundo Tsuzuki et al. (1990) o emprego do CO₂ favorece a síntese de lipídios pelas microalgas. O resultado obtido no presente estudo concorda com aquele apresentado por Castro Araújo e Garcia (2005), uma vez que, segundo estes autores a concentração de lipídios foi maior com o emprego do CO₂ nas culturas de *Chaetoceros cf. wighamii*.

Quanto ao emprego do acetato, foi verificado uma redução de 53,4 % no teor de lipídios em relação ao controle e isto parece indicar que o acetato não foi uma fonte propícia para a síntese de lipídios por estas duas espécies de microalgas, sendo que, um resultado similar foi reportado por Cerón García et al. (2005) ao empregar esta fonte suplementar de carbono em culturas de *Phaeodactylum tricornutum*.

Na Tabela 35 é apresentado o teste de comparação de médias das interações entre espécie e fase da curva de crescimento.

TABELA 35 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

Interação	Lipídios (mg/g)	Grupos homogêneos
TFL x Estacionária	159,9	a
CMU x Estacionária	127,1	b
CMU x Exponencial	96,8	c
TFL x Exponencial	93,9	c

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 19,1.

O resultado do teste de comparação de médias apontou que o maior valor para do conteúdo de lipídios foi obtido na interação TFL x Estacionária, com 159,9 mg/g, e que este valor apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) entre aqueles obtidos nas demais interações. A interação CMU x Estacionária também apresenta diferenças significativas em relação às interações CMU x Exponencial e TFL x Exponencial. Estes resultados reforçam o fato de a maior concentração de lipídios ter sido verificada na fase estacionária da curva de crescimento, independentemente da espécie de microalga.

O teste para a comparação das médias das interações entre espécie e fonte de carbono é apresentado na Tabela 36.

TABELA 36 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	Lipídios (mg/g)	Grupos homogêneos
TFL x CO ₂	201,0	a
CMU x CO ₂	150,9	b
TFL x Controle	134,7	b c
CMU x Glicose	129,0	b c
CMU x Controle	118,9	b c
TFL x Glicose	97,5	c d
CMU x Acetato	70,4	d
TFL x Acetato	53,4	d

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 32,9.

Na interação espécie x fonte de carbono, ficou evidente que o uso do CO₂ resultou num conteúdo de lipídios significativamente ($p < 0,05$) maior, independentemente da espécie. Em relação à combinação TFL x Controle, a combinação TFL x CO₂ apresentou um conteúdo de lipídios 49,2 % superior. Da mesma forma, a combinação CMU x CO₂ apresentou um teor de lipídios 23,9 % superior ao da interação CMU x Controle. O emprego de glicose não gerou qualquer variação em comparação com o controle para ambas as espécies. Entretanto o emprego do acetato causou uma redução de 59,2 % e 39,6 % em relação ao controle, respectivamente em *C. muelleri* e *T. fluviatilis*, indicando mais uma vez que, esta fonte suplementar de carbono ou a dose empregada nos cultivos causou um efeito inibitório na síntese lipídica.

O teste de comparação de médias da interação entre as fases da curva de crescimento e as fontes de carbono é apresentado na Tabela 37.

TABELA 37 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para lipídios totais (em mg/g da biomassa seca) da interação entre fases da curva de crescimento e as fontes de carbono.

Interação	Lipídios (mg/g)	Grupos homogêneos
Estacionária x CO ₂	204,9	a
Estacionária x Glicose	162,7	a b
Exponencial x CO ₂	147,1	b
Estacionária x Controle	140,1	b
Exponencial x Controle	91,6	c
Exponencial x Glicose	85,2	c
Estacionária x Acetato	66,4	c
Exponencial x Acetato	57,4	c

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 32,9.

Confirmando a discussão dos parágrafos anteriores, a interação fase x fonte de carbono indicou que a combinação Estacionária x CO₂ gerou o maior conteúdo de lipídios totais, entretanto não significativamente diferente ($p < 0,05$) daquele obtido com a combinação Estacionária x Glicose. Em relação à combinação Estacionária x Controle, a combinação Estacionária x CO₂ representou um acréscimo de 46,2 % no teor de lipídios totais. Tal resultado concorda com aquele reportado por Leman (1997),

no qual a maior concentração de lipídios ocorreu com o emprego de fontes suplementares de carbono e na fase estacionária.

O resultado obtido com o emprego do CO₂ e, em especial na fase estacionária, é tido como um acontecimento natural nos cultivos de microalgas, uma vez que, estes microrganismos iniciam a acumulação de lipídios quando existe uma super oferta de carbono no meio e ao mesmo tempo o crescimento se encontra limitado por algum outro nutriente (PERNET, 2003; SWAAF, 2003). Inclusive, e segundo Ratledge (2001), o processo de produção de lipídios em cultivos do tipo estacionário pode ser dividido em duas etapas: num primeiro momento ocorre a produção da biomassa e em seguida a acumulação dos lipídios pelas células microalgais.

Segundo Abalde et al. (1995), diferentes das plantas, as microalgas respondem a fatores ambientais com variações na síntese de ácidos graxos e, como as células microalgais que acumulam lipídios estão realizando a fotossíntese, isto significa que a rota metabólica desde a fixação do CO₂ até a síntese dos lipídios pode ser ajustada pelas células. Por conta disto, a deficiência de algum nutriente ou estresse ambiental (autossombreamento por exemplo) induz nas células a síntese de lipídios.

Já o emprego do acetato gerou uma redução tanto na fase estacionária quanto na fase exponencial, de 47,4 % e de 62,7 % respectivamente. Uma vez mais, pode-se presumir que o emprego do acetato, ou a dose empregada nos cultivos, foi inibitória da síntese de lipídios nas duas espécies de microalgas avaliadas.

5.2.5.1 Ácidos Graxos

Nas Tabelas 38 e 39 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada fonte de carbono quanto à concentração dos ácidos graxos em microgramas por miligrama (µg/mg) e o percentual relativo do total de ácidos graxos da biomassa liofilizada para as espécies *C. muelleri* e *T. fluviatilis*.

Conforme pode ser visualizado, na biomassa de *C. muelleri* foram identificados 25 ácidos graxos (e/ou isômeros), tanto saturados quanto mono e poliinsaturados.

Os ácidos graxos com maior representatividade na biomassa de *C. muelleri* foram o ácido tretadecanóico (14:0, ácido mirístico) com um teor variando entre 6,6 e 8,3 %, o ácido hexadecanóico (16:0, ácido palmítico) com 22,5 a 36,4 %, o ácido hexadecaenóico (16:1, ácido palmitoléico) com 21,6 a 36,0 %, e o ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3) com 7,5 a 19,0 % do total de ácidos graxos. Estes quatro compostos correspondem a aproximadamente 76,2 % do total de ácidos graxos identificados na biomassa desta espécie de microalga. Este resultado é semelhante aquele apresentado por Rousch, Bingham e Sommerfeld (2003), entretanto estes autores somente identificaram 11 diferentes ácidos graxos na biomassa de *C. muelleri*.

TABELA 38 – Valores médios da concentração de ácidos graxos da biomassa da biomassa seca e percentual relativo do total de ácidos graxos, para *C. muelleri* em cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	CMU															
	EXPONENCIAL								ESTACIONÁRIA							
Fase	Controle		Glicose		Acetato		CO ₂		Controle		Glicose		Acetato		CO ₂	
Tratamento	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%
Ac. Graxo																
14:0	5,0	8,1	4,1	8,3	3,6	6,9	4,3	7,2	4,1	8,7	5,1	6,6	5,8	6,8	5,4	6,8
15:0	0,4	0,6	0,4	0,7	0,2	0,4	0,3	0,5	0,3	0,7	0,7	0,9	0,4	0,5	0,7	0,5
16:0	18,7	29,6	18,0	36,4	16,3	31,8	16,5	27,7	10,7	22,5	20,5	26,1	23,8	28,0	29,4	28,0
16:1 n7	18,1	28,9	11,8	24	13,8	27,1	14,2	24	16,6	35,1	17,2	22,1	18,0	21,2	28,8	21,2
16:1 n5	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
16:1 n?	0,5	0,6	0,3	0,6	0,3	0,5	0,2	0,3	0,3	0,7	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3
16:2 n6	0,7	1,1	0,3	0,7	0,6	1,1	0,7	1,2	0,9	1,8	0,7	0,9	0,7	0,8	1,3	0,8
16:2 n4	0,5	0,9	0,4	0,9	0,5	0,9	0,9	1,5	0,8	1,6	0,8	1,0	0,7	0,8	1,5	0,8
17:0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
16:3	1,2	1,8	0,7	1,4	0,9	1,8	1,5	2,5	1,7	3,5	1,7	2,2	1,6	1,8	2,6	1,8
18:0	0,7	1,2	1,1	2,2	1,0	2,0	1,1	1,8	0,9	2,0	1,4	1,8	1,7	2,0	1,6	2,0
18:1 n9	1,1	1,7	1,5	2,9	1,1	2,0	1,0	1,7	0,4	0,8	1,6	2,1	1,8	2,2	1,5	2,2
18:1 n7	0,5	0,7	1,3	2,6	0,6	1,1	0,8	1,4	0,3	0,5	1,2	1,6	1,2	1,5	2,2	1,5
18:2 n6	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
18:2 n3	1,1	1,7	1,2	2,4	0,8	1,5	1,3	2,1	0,5	1,0	1,8	2,3	1,6	1,9	1,6	1,9
18:3 n6	1,4	2,3	1,3	2,5	1,9	3,8	1,8	3	0,4	0,9	2,0	2,6	3,6	4,3	2,9	4,3
18:3 n3	0,0	0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
18:4 n3	1,2	1,9	0,9	1,8	1,3	2,4	1,3	2,2	0,4	0,8	1,8	2,3	3,4	4,0	1,7	4,0
20:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3 n6	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,4	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1
20:4 n6	1,6	2,5	0,7	1,4	1,1	2,2	1,3	2,2	1,3	2,8	1,9	2,5	2,1	2,5	4,3	2,5
20:5 n3	8,4	13,6	3,8	7,5	5,4	10,4	9,8	16,5	6,0	12,7	14,8	19,0	13,7	16,1	16,5	16,1
22:0	0,3	0,5	0,4	0,8	0,3	0,6	0,3	0,6	0,2	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,4	0,7
24:0	0,3	0,5	0,4	0,8	0,3	0,6	0,3	0,5	0,2	0,5	0,5	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5
22:6 n3	0,8	1,3	0,5	1	1,0	2,0	1,3	2,2	0,9	1,9	2,7	3,5	2,8	3,3	2,2	3,3

TABELA 39 – Valores médios da concentração de ácidos graxos da biomassa da biomassa seca e percentual relativo do total de ácidos graxos, para *T. fluviatilis* em cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	TFL															
	EXPONENCIAL								ESTACIONÁRIA							
Fase	Controle		Glicose		Acetato		CO ₂		Controle		Glicose		Acetato		CO ₂	
Tratamento	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%
Ac. Graxo																
14:0	5,2	7,5	10,5	8,7	9,6	8,3	13,8	10,5	15,7	9,2	18,7	10,5	17,8	10,3	12,3	7,3
15:0	0,8	1,1	1,7	1,4	2,3	2,0	2,3	1,7	3,6	2,1	3,9	2,2	3,7	2,1	5,2	3,1
15:1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,8	0,5	0,9	0,5	0,8	0,5	0,4	0,2
16:0	11,7	16,9	22,7	18,8	19,9	17,2	31,0	23,6	25,1	14,8	28,6	16,0	27,2	15,7	31,1	19,1
16:1 n7	17,5	25,2	33,4	27,5	26,0	22,6	32,7	24,9	52,3	30,9	48,9	27,4	48,6	28,0	36,3	20,8
16:1 n5	0,4	0,6	0,7	0,5	0,5	0,4	0,6	0,4	0,8	0,4	0,8	0,5	1,2	0,7	0,5	0,3
16:1 n?	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,9	0,5	0,2	0,1
16:2 n6	1,0	1,4	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,6	1,1	0,7	0,8	0,5	1,2	0,7	0,6	0,4
16:2 n4	2,8	4,0	2,5	2,0	2,8	2,4	2,0	1,5	2,9	1,7	2,7	1,5	3,8	2,2	2,8	1,9
17:0	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6	0,4	0,2	0,1
16:3	2,1	3,1	7,3	6,0	6,7	5,8	5,8	4,4	10,8	6,4	10,4	5,9	7,5	4,3	9,6	5,6
18:0	0,7	1,0	0,5	0,4	0,8	0,7	0,9	0,7	0,5	0,3	0,9	0,5	1,3	0,8	0,8	0,5
18:1 n9	0,4	0,6	0,9	0,8	0,7	0,6	1,6	1,2	1,5	0,9	1,6	0,9	1,3	0,8	1,2	0,7
18:1 n7	0,5	0,7	1,6	1,3	1,3	1,1	0,9	0,7	2,1	1,2	3,6	2,0	3,1	1,8	1,5	0,9
18:2 n8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,0	0,0
18:2 n6	0,9	1,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,8	0,6	1,0	0,6	1,1	0,6	0,7	0,4	1,2	0,8
18:3 n3	1,4	2,0	0,1	0,1	0,5	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,5	0,3	1,0	0,6
18:4 n3	1,2	1,7	3,4	2,8	2,4	2,1	4,5	3,4	8,5	5,0	10,2	5,8	6,8	3,9	12,8	7,6
20:0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3 n6	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,0	0,4	0,3
20:4 n6	0,8	1,1	0,5	0,4	1,3	1,1	1,7	1,3	0,2	0,1	0,7	0,4	0,7	0,4	2,0	1,2
20:5 n3	17,2	24,8	25,2	20,9	27,4	23,7	19,8	15,1	32,4	19,1	33,7	18,9	33,5	19,3	35,9	20,6
22:0	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
24:0	0,3	0,4	1,0	0,8	1,6	1,4	0,7	0,6	0,8	0,5	0,9	0,5	1,0	0,6	1,4	0,8
22:6 n3	3,5	5,0	6,3	5,3	8,9	7,7	9,5	7,2	8,2	4,8	8,2	4,6	10,8	6,2	12,4	7,0

Semelhante ao que ocorreu com *C. muelleri*, foram também identificados 25 ácidos graxos (e/ou isômeros) na biomassa de *T. fluviatilis*, tanto saturados quanto mono e poliinsaturados. Os ácidos graxos com maior representatividade nas análises foram o ácido graxo tretadecanóico (14:0, ácido mirístico) com um teor variando entre 7,3 e 10,5 %, o ácido hexadecanóico (16:0, ácido palmítico) com 14,8 a 23,6 %, o ácido hexadecaenóico (16:1, palmitolêico) com 23,3 a 31,5 %, o ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3) com 15,1 a 24,8 % e o ácido docosahexaenóico (22:6 n-3) com um teor variando entre 4,6 e 7,7 % do total de ácidos graxos ácidos graxos identificados na biomassa. Estes cinco compostos correspondem a aproximadamente 79,7 % do total de ácidos graxos identificados na biomassa desta espécie de microalga.

O perfil dos ácidos graxos qualificados no presente trabalho foi similar àquele reportado por Zhukova e Aizdaicher (1995), num estudo com quinze diferentes espécies de microalgas e por Renaud et al. (2002) em se tratando de diatomáceas.

Na Figura 16 podem ser visualizados os percentuais dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados encontrados na biomassa microalgal.

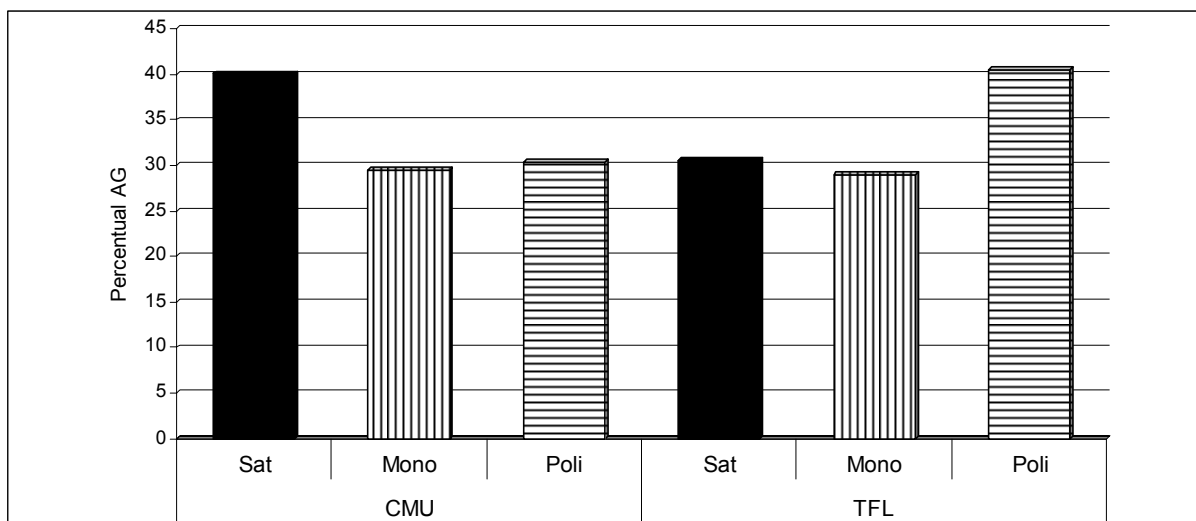


FIGURA 16 - Percentual do total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados encontrados na biomassa microalgal seca.

Conforme o índice de insaturação pode-se considerar que a espécie *C. muelleri* apresentou um percentual mais elevado de ácidos graxos saturados (40,1 %) e, um percentual praticamente igual de ácidos graxos mono (29,5 %) e poliinsaturados (30,4 %), enquanto a espécie *T. fluviatilis* apresentou um maior

percentual de ácidos graxos poliinsaturados (40,5 %) e quase os mesmos valores de ácidos graxos saturados (30,5 %) e monoinsaturados (29,0 %). Quanto à espécie *C. muelleri*, o percentual de ácidos graxos poliinsaturados é semelhante aquele obtido por Guerra, Romero e Mauri, (2004) em culturas de *C. calcitrans*, entretanto o percentual de ácidos graxos poliinsaturados obtido da biomassa de *T. fluviatilis* neste trabalho foi inferior àquele obtido pelos mesmos autores, com 52,6 % de PUFA.

5.2.5.1 Ácidos graxos poliinsaturados

Dentre os ácidos graxos poliinsaturados foram encontrados 13 diferentes compostos, os quais são apresentados (em percentual individual relativo à concentração de ácidos graxos poliinsaturados totais) na Figura 17.

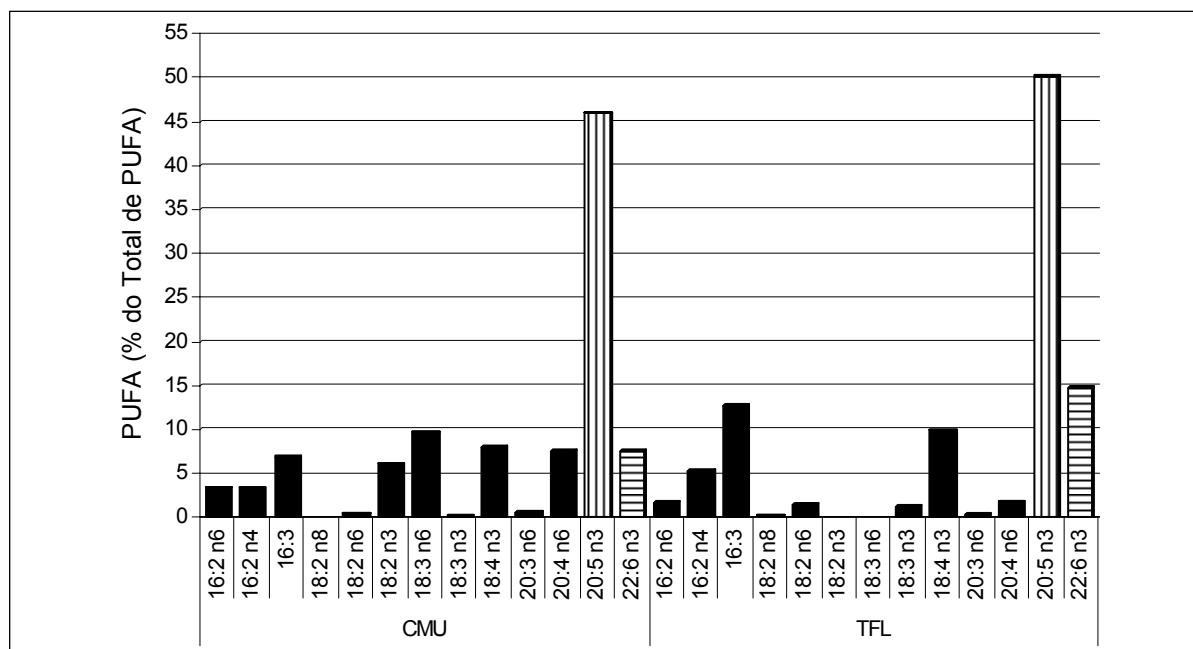


FIGURA 17 - Percentual individual relativo do total de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) obtidos na biomassa seca de *C. muelleri* e *T. fluviatilis*.

Quanto ao percentual relativo do total de PUFA, os ácidos graxos mais abundantes na biomassa da microalga *C. muelleri* foram o ácido hexadecatrienóico (16:3, com 6,9 %), o ácido octadecatrienóico (18:3 n-6, ácido gama-linolênico com 9,7 %), o ácido octadecatetraenóico (18:4 n-3, ácido estearidônico, com 8,0 %), o ácido eicosatetraenóico (20:4 n-6, ácido araquidônico, com 7,6 %), o ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA, com 46,0 %) e o ácido docosahexaenóico (22:6 n-3, DHA, com 7,6 %).

Na biomassa de *T. fluviatilis* foram predominantes o ácido hexadecatrienóico (16:3, com 12,8 %), o ácido octadecatetraenóico (18:4 n-3, ácido estearidônico, com 10,0 %), o ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA, com 50,1 %) e o ácido docosahexaenóico (22:6 n-3, DHA, com 14,6 %), sendo este resultado semelhante àquele obtido por Guerra, Romero e Mauri (2004).

Além daqueles anteriormente qualificados, foram também identificados na biomassa outros ácidos graxos poliinsaturados como o octadecadienóico (18:2 n-6 ácido linoléico) e o ácido octadecatrienóico (18:3 n-3, ácido alfa-linolênico) sendo que estes são também considerados essenciais na dieta humana uma vez que os mamíferos carecem das enzimas delta12 e delta15 desaturases, necessárias para a síntese destes compostos (DOMERGUE et al., 2002).

A espécie *C. muelleri* não apresentou o ácido octadecadienóico (18:2 n-8), enquanto a espécie *T. fluviatilis* não apresentou o ácido octadecadienóico (18:2 n-3) nem o ácido octadecatrienóico (18:3 n-6).

As ANOVA relativas ao conteúdo de EPA e de DHA das comparações entre as espécies, entre as fases da curva, entre as fontes de carbono e entre as interações destes fatores são apresentadas individualmente a seguir. As ANOVA para os demais ácidos graxos poliinsaturados e os testes de comparação de médias entre as espécies, as fases da curva, as fontes de carbono e as respectivas interações entre estes fatores são apresentados no ANEXO 2.

5.2.5.2 Ácido eicosapentaenóico (EPA)

Na Figura 18 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada fonte de carbono quanto ao teor do ácido eicosapentaenóico, em microgramas por miligramas ($\mu\text{g}/\text{mg}$), da biomassa liofilizada.

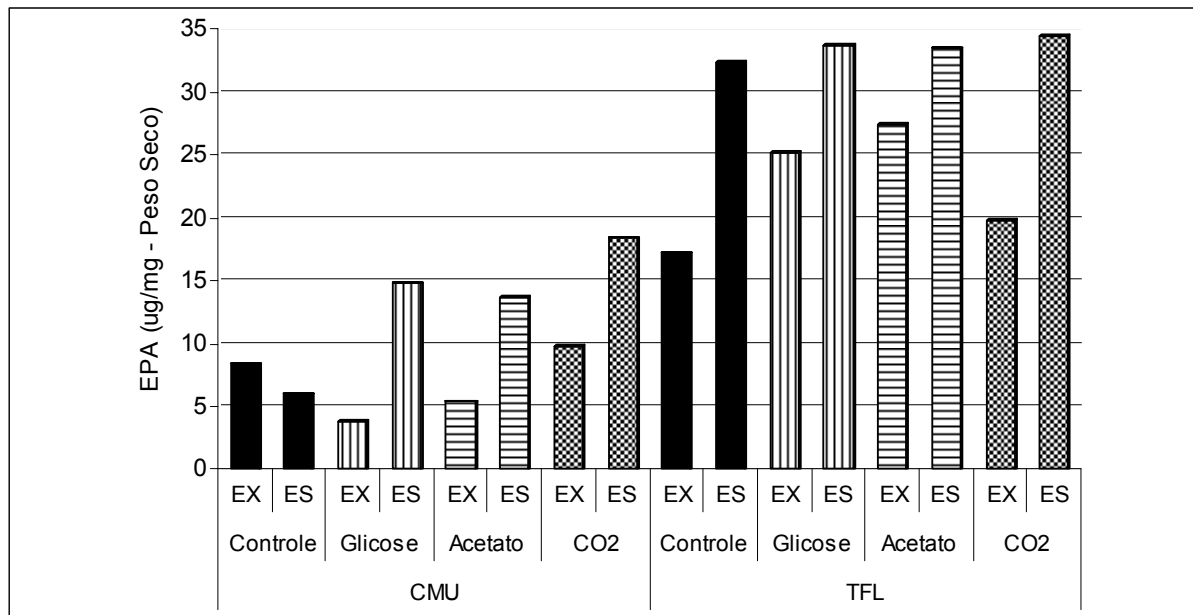


FIGURA 18 – Valores médios do conteúdo de EPA em microgramas por miligrama da biomassa seca, considerando cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária).

Ficou evidente que a espécie *T. fluviatilis* apresentou um maior conteúdo de EPA em comparação com *C. muelleri*. Praticamente em todas as fontes de carbono o conteúdo deste ácido graxo foi maior na fase estacionária da curva de crescimento.

Na Tabela 40 é apresentada a ANOVA ($p < 0,05$) para o teor EPA. Conforme o resultado da ANOVA não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos, entretanto houve diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as espécies, entre as fases da curva, entre as fontes de carbono e entre algumas das interações. Somente a interação fase x fonte de carbono apresentou diferenças significativas com $p < 0,05$.

TABELA 40 – Análise de variância fatorial para o conteúdo de EPA na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	7,80875	3,90438	0,9270
Fator 1 (espécie)	1	3956,70083	3956,70083	939,4527**
Fator 2 (fase)	1	870,40333	870,40333	206,6628**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	136,33667	45,44556	10,7903**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	82,68750	82,68750	19,6328**
Fator 1 x Fator 3	3	89,18250	29,72750	7,0583**
Fator 2 x Fator 3	3	37,63000	12,54333	2,9782*
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	207,58917	69,19639	16,4295**
Resíduo	30	126,35125	4,21171	
Total	47	5514,69000		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; ** diferença significativa com $p < 0,01$.

Para evidenciar as diferenças foram desenvolvidos os testes de comparação de médias apresentados a seguir.

Na Tabela 41 é apresentado o teste de comparação de média entre as espécies.

TABELA 41 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL	27,9	a
CMU	9,8	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 1,5.

O Teste demonstrou a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo que o maior valor foi obtido com a espécie *T. fluviatilis*, com 27,9 microgramas de EPA por miligrama de biomassa seca.

Na Tabela 42 é apresentado o teste de comparação de média entre as fases da curva de crescimento.

TABELA 42 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies.

Fase	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	23,1	a
Exponencial	16,6	b

Diferença Mínima Significativa: 1,2.

Conforme o Teste, na fase estacionária a biomassa microalgal registrou uma quantidade de EPA 58,2 % maior e significativamente diferente ($p < 0,05$) daquela encontrada na fase exponencial. Isto parece indicar que a acumulação deste ácido graxo ocorreu neste momento da curva de crescimento, sendo que, este resultado também foi verificado por Brown et al. (1997), por Arão, Yamada e Kawaguchi, (1987) e por Olivera (1998), apesar da quantidade deste ácido graxo ter sido muito superior no presente trabalho em relação ao último autor citado. Segundo Kile (1986) e Zhukova e Aizdaicher (1995), de uma maneira geral os PUFA são mais abundantes na fase estacionária.

Na Tabela 43 é apresentado o teste de comparação de médias entre as fontes de carbono.

TABELA 43 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies.

Fonte de carbono	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CO ₂	20,1	a
Acetato	19,9	a
Glicose	19,4	a
Controle	16,0	b

Diferença Mínima Significativa: 1,7.

Pode-se observar que o emprego de qualquer uma das fontes suplementares de carbono resultou num acréscimo, com diferenças significativas ($p < 0,05$), no teor de EPA em relação ao controle. O emprego do CO₂ resultou no maior valor, com uma diferença de 25,6 % do controle, sugerindo o uso desta fonte, e das outras também, no intuito de aumentar da síntese deste ácido graxo na biomassa das microalgas das espécies empregadas neste estudo. Tal resultado, parece indicar que neste tipo de cultivo, a maior oferta de carbono resultou numa maior

acumulação de ácidos graxos poliinsaturados pelas microalgas, sendo que, resultado similar foi reportado por Wen e Chen (2000 b) em cultivos da diatomácea *Nitzschia laevis*.

Na Tabela 44 é apresentado o teste de comparação de médias para o teor de EPA da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

TABELA 44 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

Interação	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x Estacionária	33,5	a
TFL x Exponencial	22,4	b
CMU x Estacionária	12,7	c
CMU x Exponencial	6,8	d

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 1,7.

A interação TFL x Estacionária resultou no maior conteúdo de EPA, seguida pela interação TFL x Exponencial, sendo que todas as interações mostraram-se significativamente ($p < 0,05$) diferentes e, a interação CMU x Exponencial apresentou um teor de EPA quase cinco vezes menor do que aquele verificado na interação citada no início deste parágrafo.

Na Tabela 45 é apresentado o teste de comparação de médias para o conteúdo de EPA da interação entre espécie e fonte de carbono.

TABELA 45 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
TFL x Acetato	30,4	a	
TFL x Glicose	29,4	a	
TFL x CO ₂	27,1	a	b
TFL x Controle	24,8	b	
CMU x CO ₂	13,2	c	
CMU x Acetato	9,5	c	d
CMU x Glicose	9,3	d	
CMU x Controle	7,2	d	

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 2,8.

O Teste mostrou que todas as combinações da espécie *T. fluviatilis* resultaram em valores significativamente superiores ($p < 0,05$) aos obtidos com *C. muelleri* para todas as fontes de carbono. O emprego das fontes suplementares de carbono causou aumento da concentração de EPA para ambas as espécies. O emprego do CO₂ resultou num aumento significativamente diferente ($p < 0,05$) de 83,3 % na concentração de EPA na biomassa de *C. muelleri* em relação à interação CMU x Controle.

Na Tabela 46 é apresentado o teste de comparação de médias para o teor de EPA da interação entre a fase da curva de crescimento e fonte de carbono.

TABELA 46 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase da curva de crescimento e fonte de carbono.

Interação	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária x CO_2	25,5	a
Estacionária x Glicose	24,2	a
Estacionária x Acetato	23,6	a
Estacionária x Controle	19,2	b
Exponencial x Acetato	16,4	b c
Exponencial x CO_2	14,8	c
Exponencial x Glicose	14,5	c
Exponencial x Controle	12,8	c

Diferença Mínima Significativa: 2,8.

O Teste apontou a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para o conteúdo de EPA entre as interações. As interações Estacionária x CO_2 , Estacionária x Glicose e Estacionária x Acetato apresentaram os maiores valores e as médias foram homogêneas entre si e diferentes estatisticamente das demais. As interações Estacionária x Controle e Exponencial x Acetato apresentaram valores intermediários e médias homogêneas entre si. De uma maneira geral, na fase exponencial foram observados os menores valores de EPA, independentemente da fonte de carbono. A interação Exponencial x Controle resultou no menor valor para o conteúdo deste ácido graxo, com $12,8 \mu\text{g}/\text{mg}$ na biomassa seca.

O teste de comparação de médias para o conteúdo de EPA das interações entre a espécie, a fase da curva de crescimento e fonte de carbono, é apresentado na Tabela 47.

TABELA 47 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie, fase da curva de crescimento e fonte de carbono.

Interação	EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x Estacionária x CO ₂	34,5	a
TFL x Estacionária x Glicose	33,7	a
TFL x Estacionária x Acetato	33,5	a b
TFL x Estacionária x Controle	32,4	a b
TFL x Exponencial x Acetato	27,4	b c
TFL x Exponencial x Glicose	25,2	c d
TFL x Exponencial x CO ₂	19,8	d e
CMU x Estacionária x CO ₂	18,4	e
TFL x Exponencial x Controle	17,2	e
CMU x Estacionária x Glicose	14,8	e f
CMU x Estacionária x Acetato	13,7	e f g
CMU x Exponencial x CO ₂	9,8	f g h
CMU x Exponencial x Controle	8,4	g h
CMU x Estacionária x Controle	6,0	h
CMU x Exponencial x Acetato	5,4	h
CMU x Exponencial x Glicose	3,8	h

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 2,4.

O resultado do teste de comparação de médias apontou que os maiores valores (com diferenças significativas para $p < 0,05$) quanto ao conteúdo de EPA foram obtidos nas interações de TFL na fase estacionária, independentemente da fonte de carbono. Os maiores valores foram obtidos nas interações TFL x Estacionária x CO₂, com 34,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e TFL x Estacionária x Glicose com 33,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$, sem diferenças significativas entre as demais interações TFL x Estacionária x fonte de carbono. As interações TFL x exponencial apresentaram valores médios para todas as fontes de carbono avaliadas, enquanto as interações CMU x fase x fonte de carbono resultaram nos menores valores, sendo que a interação CMU x Exponencial x Glicose apontou o menor valor, com 3,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de EPA na biomassa liofilizada.

Ficou portanto evidente que o a microalga *T. fluviatilis* apresentou o maior conteúdo de EPA entre as espécies, que na fase estacionária ocorreu a maior

acumulação e que todas as fontes suplementares de carbono repercutiram num acréscimo no teor deste ácido graxo na biomassa microalgal de ambas as espécies.

5.2.5.3 Ácido docosahexaenóico (DHA)

Na Figura 19 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada fonte de carbono quanto ao conteúdo do ácido docosahexaenóico, em microgramas por miligramas ($\mu\text{g}/\text{mg}$), da biomassa liofilizada.

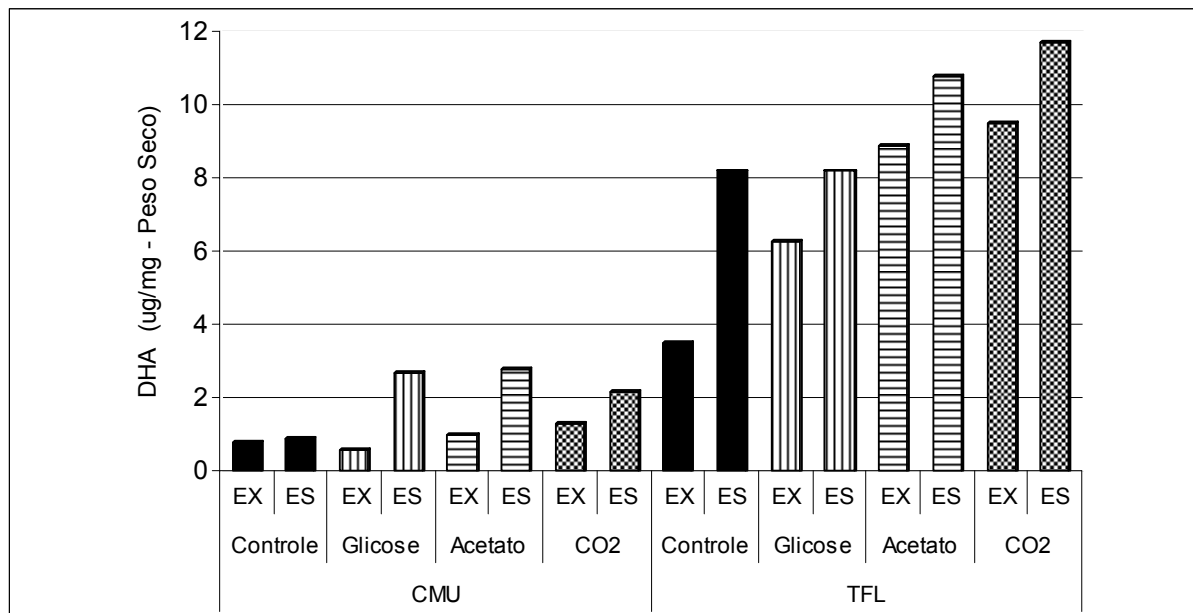


FIGURA 19 – Valores médios do conteúdo de DHA em microgramas por miligrama da biomassa seca, considerando cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para fonte de carbono (EX = fase exponencial e ES = fase estacionária).

Pode-se perceber que a espécie *T. fluviatilis* apresentou o maior teor do ácido graxo DHA e que também, o conteúdo deste composto sempre foi mais elevado na fase estacionária da curva de crescimento.

Na Tabela 48 é apresentada a ANOVA ($P < 0,05$) para o conteúdo de DHA. A ANOVA apontou que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os blocos e que o conteúdo de DHA na biomassa apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) entre as espécies, as fases da curva, entre as fontes de carbono e entre algumas das interações.

TABELA 48 – Análise de variância fatorial para o conteúdo de DHA na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	3,04292	1,52146	1,2036
Fator 1 (espécie)	1	560,33333	560,33333	443,2579**
Fator 2 (fase)	1	45,63000	45,63000	36,0961**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	61,90833	20,63611	16,3244**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	6,453333	6,453333	5,1050*
Fator 1 x Fator 3	3	29,71167	9,90389	7,8346**
Fator 2 x Fator 3	3	1,24833	0,41611	8,3292
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	11,35500	3,78500	2,9942*
Resíduo	30	37,92375	1,26413	
Total	47	757,60667		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; ** diferença significativa com $p < 0,01$.

Para evidenciar as diferenças foram desenvolvidos os testes de comparação de médias apresentados a seguir. Na Tabela 49 é apresentado o teste de comparação de médias entre as espécies.

TABELA 49 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL	8,4	a
CMU	1,6	b

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 0,7.

O conteúdo de DHA em *T. fluviatilis* foi significativamente diferente ($p < 0,05$) e superior (mais de cinco vezes) ao encontrado na microalga *C. muelleri*, indicando que, se objetivo é a obtenção deste ácido graxo, o cultivo da espécie *T. fluviatilis* é o mais indicado. Este resultado está em concordância com aqueles apresentados por Brown et al. (1997) na comparação de *C. muelleri* com *Thalassiosira pseudonana*. Segundo Volkman et al. (1989), a microalga *T. pseudonana* apresentou a maior quantidade deste ácido graxo quando comparada com outras diatomáceas, sendo

estes resultados similares àquele reportado por Ishida et al. (2000) com a espécie *T. weissflogii*.

Na Tabela 50 é apresentado o teste de comparação de média entre as fases da curva de crescimento

TABELA 50 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento, considerando ambas as espécies.

Fase	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	5,9	a
Exponencial	4,0	b

Diferença Mínima Significativa: 0,7.

Na fase estacionária foi verificado o maior conteúdo de DHA na biomassa, com diferença significativa ($p < 0,05$), provavelmente indicando ser esta a fase com maior bioacumulação deste ácido graxo, resultado que discorda daquele reportado por Olivera (1998) em culturas de *C. calcitrans*. Entretanto, Fidalgo et al. (1998) e Fidalgo et al. (1990), reportaram que a composição bioquímica da biomassa foi bastante afetada pela fase da curva de crescimento em culturas de *Isochrysis galbana* e *Phaeodactylum tricornutum*, respectivamente. O maior conteúdo de proteínas foi verificado na fase exponencial, enquanto o maior conteúdo de lipídios e de PUFA foram obtidos na fase estacionária. Este acontecimento pode ser explicado, uma vez que geralmente a acumulação dos triacilgliceróis tem sido relacionada com o fim da divisão celular, o qual ocorre no início da fase estacionária (HODGSON et al., 1991).

Na Tabela 51 é apresentado o teste de comparação de média entre as fontes de carbono.

TABELA 51 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono, considerando ambas as espécies.

Fonte de carbono	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CO ₂	6,2	a
Acetato	5,9	a
Glicose	4,4	b
Controle	3,4	b

Diferença Mínima Significativa: 1,2.

O emprego de acetato e de CO₂ resultou em maior teor de DHA, significativamente diferente ($p < 0,05$), daqueles obtidos com glicose e no controle. Em relação ao controle, o CO₂ gerou uma quantidade 82 % superior, indicando que este foi um a fonte de carbono eficiente na síntese deste ácido graxo.

Na Tabela 52 é apresentado o teste de comparação de médias para o conteúdo de DHA da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

TABELA 52 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase da curva de crescimento.

Interação	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x Estacionária	9,7	a
TFL x Exponencial	7,0	b
CMU x Estacionária	2,1	c
CMU x Exponencial	0,9	c

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 0,9.

Pode-se verificar que a interação TFL x Estacionária apresentou o maior conteúdo de EPA, sendo este significativamente diferente ($p < 0,05$) e muito superior àqueles obtidos nas demais interações. As interações TFL x fase, igualmente apontaram significativas diferenças na concentração deste ácido graxo em comparação com aquelas verificadas na biomassa de *C. muelleri*, a qual apresentou valores muito inferiores.

Na Tabela 53 é apresentado o teste de comparação de médias para o conteúdo de DHA da interação entre espécie e fonte de carbono.

TABELA 53 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x CO ₂	10,6	a
TFL x Acetato	9,8	a
TFL x Glicose	7,3	b
TFL x Controle	5,8	b
CMU x Acetato	1,9	c
CMU x CO ₂	1,8	c
CMU x Glicose	1,6	c
CMU x Controle	0,9	c

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 1,5.

Todas as interações com a espécie TFL apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação com aquelas da microalga CMU, independentemente da fonte de carbono. A interação TFL x CO₂ resultou no maior valor observado (10,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$) para o teor de DHA na biomassa seca, resultado que não difere significativamente da interação TFL x Acetato, entretanto estas duas interações diferem das demais interações. As interações TFL x Glicose e TFL x Controle apresentaram valores médios, enquanto todas as interações da espécie CMU apresentaram médias significativamente diferentes e valores muito reduzidos quanto ao conteúdo de DHA. O emprego do CO₂ gerou um acréscimo no teor de DHA na ordem de 82,8 % na biomassa de *T. fluviatilis* e de 100 % em *C. muelleri*.

O teste de comparação de médias para DHA das interações entre a espécie, a fase da curva de crescimento e a fonte de carbono é apresentado na Tabela 54.

TABELA 54 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o conteúdo de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie, fase da curva de crescimento e fonte de carbono.

Interação	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos			
TFL x Estacionária x CO_2	11,7	a			
TFL x Estacionária x Acetato	10,8	a	b		
TFL x Exponencial x CO_2	9,5	a	b	c	
TFL x Exponencial x Acetato	8,9	a	b	c	
TFL x Estacionária x Controle	8,2			b	c
TFL x Estacionária x Glicose	8,2			b	c
TFL x Exponencial x Glicose	6,3			c	d
TFL x Exponencial x Controle	3,5			d	e
CMU x Estacionária x Acetato	2,8				
CMU x Estacionária x Glicose	2,7				
CMU x Estacionária x CO_2	2,2				
CMU x Exponencial x CO_2	1,3				
CMU x Exponencial x Acetato	1,0				
CMU x Estacionária x Controle	0,9				
CMU x Exponencial x Controle	0,8				
CMU x Exponencial x Glicose	0,6				

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*. Diferença Mínima Significativa: 3,4.

Na interação espécie x fase x fonte de carbono ficou evidente que o teor de DHA foi maior em todas as interações de *T. fluviatilis* independentemente da fonte, entretanto, esta espécie quando na fase estacionária e com o emprego do CO_2 apresentou uma biomassa mais rica em DHA. De uma maneira geral, todas as espécies apresentaram menor conteúdo deste ácido graxo na fase exponencial e, com o emprego de qualquer fonte de carbono.

Na Tabela 55 são apresentados dados reportados na literatura sobre a composição bioquímica (biomassa seca) das microalgas dos gêneros *Chaetoceros* e *Thalassiosira* e aqueles obtidos neste trabalho.

TABELA 55 – Composição bioquímica (em percentual da biomassa seca) de microalgas dos gêneros *Chaetoceros* e *Thalassiosira*.

Espécie	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Fonte
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10	1
<i>C. cf. wighamii</i>	35 – 45	14 – 16	14 - 22	2
<i>Chaetoceros</i> sp (CS256)	57,3	13,1	16,8	3
<i>Chaetoceros</i> sp.	31,9	9,4	22,2	4
<i>C. ceratosporum</i>	-	-	12,9	5
<i>C. muelleri</i>	21,1 – 44,9	5,8 – 11,0	6,9 – 13,6	7
<i>C. muelleri</i> (neste trabalho)	20,8 – 34,1 (média = 28,9*)	9,7 – 23,1 (média = 17,9*)	7,4 – 17,9 (média = 11,2*)	
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	-	-	27,7	5
<i>T. pseudonana</i>	29	17	10	1
<i>T. weisflogii</i>	-	-	22 - 24	6
<i>T. fluviatilis</i> (neste trabalho)	23,9 – 44,3 (média = 33,8*)	10,3 – 23,7 (média = 16,6*)	4,0 – 23,0 (média = 12,7*)	

1 – BECKER, 1988; 2 - CASTRO ARAUJO; GARCIA, 2005; 3 – RENAUD et al., 2002; 4 – SÁNCHEZ-SAAVEDRA; VOLTOLINA, 1994; 5 – LEAL; DIAZ; GARCIA, 1990; 6 – BOROWITZKA, 1988b; CUEVAS-ROCHA, 2001. * média geral, não considerando a fase da curva nem a fonte de carbono.

Os valores obtidos quanto à composição bioquímica da biomassa microalgal (seca) estão em concordância com aqueles verificados em outros experimentos. Pode-se perceber que, tanto os dados (médios) obtidos neste trabalho quanto aqueles reportados na literatura, apresentam grandes variações quanto à concentração dos diferentes constituintes da biomassa microalgal.

Segundo Fernández-Reiriz et al., (1989) as especificidades dos estudos com microalgas têm gerado dificuldades analíticas. O dados acumulados nos diversos trabalhos vêm permitindo o Estabelecimento de padrões na composição bioquímica de diversas espécies e mesmo de grupos taxonômicos. Entretanto, a interpretação destes dados deve ser efetuada com algumas ressalvas, uma vez que, a maioria dos trabalhos apresenta descrições do conteúdo da biomassa em um único momento, situação que pode conduzir a generalizações errôneas a cerca da composição bioquímica das microalgas. Além disso, as condições de experimentais são freqüentemente muito distintas, introduzindo diversas variáveis que dificultam a comparação dos resultados. Sendo então necessário interpretar as informações não simplesmente como valores absolutos referentes à natureza das espécies, mas

também como resposta relativa das condições empregadas nos cultivos (sistema de cultivo, estado fisiológico da cultura etc).

Quanto à fase da curva de crescimento, foi verificado que a maior concentração de lipídios, EPA e DHA ocorreu na fase estacionária para ambas as espécies. O conteúdo de carboidratos foi praticamente igual e o conteúdo de proteínas hidrossolúveis foi maior na fase exponencial na biomassa de *C. muelleri* e na fase estacionária na biomassa de *T. fluviatilis*. Este resultado concorda com aquele reportado por Brown, Jeffrey e Garland (1989), os quais afirmam que, de maneira geral, o conteúdo de lipídios e/ou de carboidratos aumenta na fase estacionária enquanto o conteúdo de proteínas se torna reduzido, devido à limitação de nutrientes especialmente de nitrogênio.

Quando os nutrientes estão disponíveis em abundância são sintetizadas proteínas, entretanto, quando os nutrientes estão limitados a divisão celular é suspensa e uma grande quantidade de carbono é disponibilizada para a estocagem de lipídios (SUSENIK; WAHNON, 1991; MCGINNIS; DEMPSTER; SOMMERFELD, 1997).

Quando ao rendimento das culturas, expresso como biomassa seca por litro, para ambas as espécies e para todas as fontes de carbono, os dados mostraram valores considerados adequados em se tratando destas espécies em cultivos fotoautotróficos. Entretanto, era esperado que naquelas culturas com fontes suplementares de carbono tivessem ocorrido maiores rendimentos. Isto parece indicar que estas cepas não crescem (ou não assimilam carbono orgânico de maneira energeticamente viável) de forma heterotrófica e/ou mixotrófica.

O rendimento (biomassa seca) obtido, entre 0,5 e 1,1 g/L, segundo Harel e Place (2004), é considerado normal nestas condições de cultivo, entretanto pode ser considerado baixo visando a aplicação comercial destas microalgas. Os mesmos autores relatam rendimentos maiores do que 75 g/L em condições heterotróficas. O baixo rendimento é característico de cultivos fotoautotróficos do tipo estacionário, nos quais o autossombreamento limita o crescimento da população microalgal (GLADUE; MAXEY, 1994).

Uma das possibilidades para aumentar a eficiência em cultivos fotoautotróficos pode ser a aplicação de diluição da cultura a cada intervalo de tempo (cultivo semicontínuo) ou a retirada de parte da biomassa da cultura a cada intervalo de tempo. Estes métodos, por certo geram um ganho no rendimento das culturas, entretanto há necessidade de equipamento adequado e da aplicação de técnicas que podem elevar os custos de produção (RICHMOND, 2004).

A determinação dos custos de produção não foi objeto deste estudo, além disso, é praticamente impossível extrapolar os dados de produção em escala experimental para escala comercial, já que, isto feito, poderiam ser gerados dados equivocados (TREDICI, 2004).

Mesmo sendo ambas as espécies cultivadas eficientemente em escala comercial, para a utilização na alimentação de organismos cultivados comercialmente (como crustáceos e moluscos), pelos dados obtidos revelando a baixa produtividade alcançada nos cultivos, estas microalgas necessitam mais estudos (especialmente em outros sistemas de cultivo) para que sejam empregadas como fontes economicamente viáveis de ácidos graxos poliinsaturados.

6. CONCLUSÕES

O emprego do CO₂ promoveu uma maior densidade celular nas culturas de *Chaetoceros muelleri*. A utilização de glicose e acetato não causou diferenças em relação ao controle.

Nenhuma das fontes suplementares de carbono causou variação na densidade celular para a espécie *Thalassiosira fluviatilis*.

Nenhuma das fontes suplementares de carbono causou variação no tempo de cultivo e na velocidade de crescimento de ambas as espécies.

C. muelleri apresentou maior biomassa e maior conteúdo de carboidratos, enquanto *T. fluviatilis* apresentou maior conteúdo de proteínas hidrossolúveis, de lipídios e dos ácidos graxos EPA e DHA.

A maior biomassa, o maior conteúdo de lipídios e de EPA e DHA foram verificados na fase estacionária para ambas as espécies.

O conteúdo de carboidratos não apresentou variação entre as fases da curva.

O conteúdo de proteínas hidrossolúveis foi maior na fase exponencial nas culturas de *C. muelleri* e na fase estacionária nas culturas de *T. fluviatilis*.

O emprego do CO₂ resultou numa maior biomassa, num maior conteúdo de proteínas hidrossolúveis e de lipídios para ambas as espécies.

O emprego do acetato resultou num menor conteúdo de carboidratos.

O conteúdo de EPA foi maior com o emprego de qualquer uma das fontes suplementares de carbono e o conteúdo de DHA foi maior com o emprego de CO₂ e acetato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J. et al. **Microalgas**: cultivo e aplicaciones. Monografias, n. 26, Universidade da Coruña: España, 1995. 210 p.

ABE, D. S.; GALVÃO, S. M. F. G. Pigment chromatic adaptation in *Cyclotella caspia* Grunow (Bacillariophyta). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 123-130, 1991.

AGUSTI, S. Light environment within dense algal populations: cell size influence on self-shading. **Journal of Plankton Research**, v. 13, n. 4, p. 863-872, 1991.

ÁLVAREZ, M.; GALLARDO, T. Una revisión sobre la biotecnología de las algas. **Botânica Complutensis**, n. 15, p. 9-60, 1989.

APT, K. E.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology**, n. 35, p. 215-226, 1999.

ARAO, T.; YAMADA, M.; KAWAGUCHI, A. Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry**, n. 26, p. 2573-2576, 1987.

ARREDONDO-VEGA, B. O. **Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum***. 1995. 138 f.. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Facultad de Farmácia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1995.

ARREDONDO-VEGA, B. O. et al. **Manual de Técnicas Aplicadas en Ficología**. Centro de Investigaciones del Noroeste - CIBNOR (México), La Paz, 1997, 41 p.

BALECH, E. **Introducción al Fitoplancton Marino**. Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1977. 212 p.

BARBOSA, M. J. G. V. **Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation.**, 2003, 166 f.. Tese (Doutorado em Ciências), Wageningen University, Wageningen, 2003.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; CHIST, Y.; BANERJEE, U. C. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 22 (3), p. 245-279, 2002.

BECKER, E. W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, J. L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 222-254.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, n. 2, p. 105-125, 1984.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 312-351.

BELARBI, E. H.; MOLINA, E.; CHRISTI, Y. A. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish. **Process Biochemistry**, n. 35, p. 951-969, 2000.

BEN-AMOTZ, A. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Dunaliella*. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 273-280.

BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v. 37, n. 3, p. 911-917, 1959.

BONECKER, A. C. T.; BONECKER, S. L. C.; BASSANI, C. O plâncton marinho. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Interciência: Rio de Janeiro, 2002. p. 103-125.

BONEY, A. D. **Phytoplankton: new studies in biology**. 2 ed. London: Edward Arnold, 1989, 118 p.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. 477 p.

BOROWITZKA, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, J. L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 153-196. (a)

BOROWITZKA, M. A. Fats, oils and hydrocarbons. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, J. L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 257-287. (b)

BOROWITZKA, M. A. Products from microalgae. **Infofish Internatonal**, n. 5, p. 21-26, 1993.

BOROWITZKA, M. A. Large-scale algal culture systems: the next generation. **Australasian Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 212-215, 1994.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.

BOYD, C. E. **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Birmingham: Birmingham Publishing, 1990. 482 p.

BRONW, M. R.; JEFFREY, S. W.; GARLAND, C. D. **Nutritional aspects of microalgae used in mariculture**: a literature review. Hobart: CSIRO Marine Laboratories (Australia), Report 205, 1989, 44 p.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 145, p. 79-99, 1991.

BRONW, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, n. 151, p. 315-331, 1997.

BRUNO, J. J. **Edible Microalgae**: a review of the health research, v. 3. Pacifica: Center for Nutritional Psychology, 2001. 56 p.

BUITRAGO, E. et al. **Efecto de la deficiencia en sílice sobre el crecimiento y la calidad nutricional de la diatomea marina *Chaetoceros calcitrans***. Memoria. Sociedad de Ciencias Naturales La salle (Venezuela), n. 142, p. 15-21, 1994.

CASTRO ARAÚJO, S.; GARCIA, V. M. T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, n. 246, p. 405-412, 2005.

CERÓN GARCÍA, M. C. et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p. 239-248, 2000.

CERÓN GARCÍA, M. C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297-305, 2005.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 1-14, 1999.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Technology and Biotechnology**, v. 14, p. 421-426, 1996.

CHEN, F.; CHEN, H.; GONG, X. D. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behavior of the cell-suspensions. **Bioresource Technology**, n. 62, v. 1-2, p. 19-24, 1997.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 20, p. 221-242, 1997.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews: RICHMOND, A. (ed.). Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p. **Biotechnology Advances**, n. 22, p. 565-567, 2004.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, n. 3, v. 1, p. 21-34, 2004.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste – CIBNOR. **Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología**. La Paz: CIBNOR(México), 2002. 51 p.

CID, A.; ABALDE, J.; HERRERO, C. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). **Journal of Applied Phycology**, n. 4, p. 31-37, 1992.

COBELAS, M. A.; LECHADO, J. Z. Lipids in microalgae. A review. I. Biochemistry. **Grasas y Aceites**, n. 40, p. 118-145, 1989.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1986. p. 421-454.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59c, p. 55-59, 2004.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgar Blücher, 1977. 264 p.

CRYSMADHA, T.; BOROWITZKA, M. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in tubular photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, n. 6, p. 67-74, 1994.

CUEVAS-ROCHA, F. **Crecimiento y composición de microalgas en tres laboratorios comerciales de producción de larvas de camarón**. 2001. 71 f. Disertación (Maestría en Acuicultura) - Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, 2001.

CUPP, E. E. **Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America**. Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography of University of California. La Jolla: University of California, v. 5, n. 1, 1943. 238 p.

DARLEY, W. M. Algal Biology: a physical approach. In: WILKINSON, J. F. (ed.) **Basic Microbiology**. v. 9, Blackwell Scientific Publications, 1982, p. 30-52.

DE PAUW, N.; PERSOONE, G. Micro-algae for aquaculture. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, J. L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 197-221.

DERNER, R. B. et al. **Estudio preliminar sobre el crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* a diferentes fotoperiodos em ambientes cerrados y abiertos**. Memoria. Sociedad de Ciencias Naturales La salle (Venezuela), n. 142, p. 15-21, 1994.

DERNER, R. B. **Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe *Bacillariophyceae*) sob diferentes regimes de iluminação, na Região sul do Brasil**. 1995. 108 f.. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.

DERNER, R. Cultivo de plantas aquáticas. In: VINATEA ARANA, L. (ed.) **Fundamentos de Aqüicultura**. Florianópolis: UFSC, 2004. p. 85-10.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, 2006. (inédito)

DOMERGUE, F. et al. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, n. 269, p. 4105-4113, 2002.

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. (ed.) **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 101-116.

DUNSTAN, G. A. et al. Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, n. 5, p. 71-83, 1993.

EPPLEY, R.W. **The Growth and Culture of Diatoms**: the biology of diatoms. Botanical Monographs, v.13, Oxford: Blackwell Scientific, 1977. 64 p.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 1988. 575 p.

FÁBREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. **Aquaculture**, v. 83, p. 289-304, 1989.

- FÁBREGAS, J. et al. Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. **Journal of General and Applied Microbiology**, n. 40: 553-540, 1994.
- FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic Photosynthesis**. Oxford: Blackwell Science, 1990. 375 p.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J. et al. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.
- FIDALGO, J. P. et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, n. 166, p. 105-116, 1998.
- FIDALGO, J. P. et al. Incidencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos masivos. IN: Congreso Nacional de Acuicultura, 3, 1990, Santiago de Compostela. **Actas del ...** Santiago de Compostela, 1990. p. 651-656.
- FOY, R. H.; GIBSON, C. E. The influence of irradiance, photoperiod and temperature on growth kinetics of three planktonic diatoms. **European Journal of Phycology**, v. 28, n. 4, p. 203-212, 1993.
- FRANKE, H. et al. Polyunsaturated fatty acids from microalgae. **International Food Ingredients**, n. 4, p. 46, 1997.
- FULKS, W.; MAIN, K. L. (eds.). Rotifer and Microalgae Culture Systems. In: US-ASIA Workshop, 1991, Honolulu. **Proceedings ...** Honolulu, 1991. 364 p.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends Biotechnol**, n. 15, p. 401 – 409, 1997.
- GLADUE, R. M. Heterotrophic microalgae production: potential for application to aquaculture feeds. In: FULKS, W.; MAIN, K. (eds.). Rotifer and Microalgae Culture Systems. In: US-ASIA Workshop, 1991, Honolulu. **Proceedings ...** Honolulu, 1991. p. 275-286.
- GLADUE, R. M.; MAXEY, J. E. Microalgal feeds for aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, n. 6, p. 131-141, 1994.
- GOLDMAN, J. C. Biomass production in mass culture of marine phytoplankton at varying temperatures. **Journal of Experimental Marine Biological and Ecology**, v. 27, p. 156-161, 1977.

GROBBELAAR, J. U. Algal Biotechnology: real opportunities for África. **South African Journal of Botany**, n. 70 (1), p. 140-144, 2004. a

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition: mineral nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 97-1117. b

GUERRA, M.; ROMERO, T.; MAURI, Y. **Evaluación de tres cepas de *Thalassiosira* en dos medios de cultivo para su uso en el desarrollo de *Litopenaeus vannamei***. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 3. Comunicación Científica CIVA 2004, p. 218-223. Disponível em <<http://www.civa2004.org>>. Acessado em 23 de out de 2004.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHARLEY, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, 1975. p. 29-60.

GUNKEL, W. Light: bacteria, fungi and blue-green algae. In: KINNE, O. (ed.). **Marine Ecology**; a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. London: Wiley Interscience, 1970, p.103-123.

GUNSTONE, F. D. (ed.) **Structured and Modified Lipids**, New York: Marcel Dekker, 2001. p. 351-399.

HAREL, M.; PLACE, A. L. Heterotrophic production of marine algae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 513-524.

HARRISON, P.J., THOMPSON, P.A., CALDERWOOD, G.S. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, n. 1, p. 45-56, 1990.

HELLENBUST, J. A. Light: plants. In: KINNE, O. (ed.). **Marine Ecology**. A Comprehensive, Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters, London: Wiley Interscience, 1970, p.124-158.

HELLENBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). **Handbook of Phycological Methods**. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University, 1978. p. 95-97.

HERRERO, C.; CID, A. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. **Aquaculture Engineering**, v. 10, p. 99-110, 1990.

HODGSON, P. A.; HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R.; LEFTLEY, J. W. Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture: I. The growth cycle. **Journal of Applied Phycology**, n. 3, p. 169-181, 1991.

HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University, 1995. 623 p.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 264-272.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

ISHIDA, Y. et al. A highly CO₂-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, n. 66, p. 655-659, 2000.

JIANG, Y.; CHEN, F.; LIANG, S. Production potential of docosahexaenoic acid by heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 633-637, 1999.

JOURDAN, J. P. **Cultivez Votre Spiruline** – manuel de culture artisanale, 1996. Capturado em 20 mar. 2004. Disponível na internet <http://www.spirulinasource.com/cultivez>.

KAPLAN, D. et al. Algal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 147-197.

KINNE, O. (ed.). **Marine Ecology**. A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. v. 1, part 1. London: Wiley Interscience, 1970, 1774 p.

KIRK, E. A.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology** n. 35, p. 215–226, 1999.

KITANO, M.; MATSUKAWA, R.; KARUBE, I. Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp under mixotrophic conditions. **Journal of Applied Phycology**, n. 9, v. 6, p. 559–63, 1997.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). **Handbook of Phycological Methods**. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University, 1978. p. 95-97.

KYLE, D. J. et al. Microalgae as source of EPA-containing oils. **Journal of General Microbiology**, v. 6, p. 127-134, 1986.

LAINING, I. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 44, p. 161-166, 1985.

LEAL, S.; DIAZ, R.; GARCIA, E. Composición bioquímica de cuatro especies de microalgas marinas en cultivo. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 11, n. 3, p. 261-284, 1990.

LEBEAU, T.; ROBERT, J. M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 60, p. 624-632, 2003.

LEE, Y. K. et al. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, n. 8, p. 163-169, 1996.

LEE, Y. K. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 116-124.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. LODI, W. R.; SIMÕES, A. A. (trads.). São Paulo: Sarvier, 1990. 532 p.

LEMAN, J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potencial. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 195-243, 1997.

LIPS, S. H.; AVISAR, Y. J. Photosynthesis and ultra structure in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 45-67.

LOURENÇO, S. O. **Variação da Composição Bioquímica de Microalgas Marinhas em Cultivos com Ênfase nos Efeitos da Disponibilidade do Elemento Nitrogênio**. 1996. 164 f.. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

LOURENÇO, S. O.; MARQUES Jr, A. N. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 195-227.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265-275, 1951.

MARSH, B. J.; WEINSTEIN, B. D. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, p. 574-576, 1966.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 20-39.

McGINNIS, K. M.; DEMPSTER, T. A.; SOMMERFELD, M. R. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *C. muelleri*. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 19-24, 1997.

MENDES, L. B. B.; WAGENER, K. High *Spirulina* productivity under intensive light. **Algological Studies**, n. 103, (Cyanobacterial Research 2), Archiv für Hydrobiologie – Supplementbände, v. 140, p. 151-160, 2001.

MENDES, P. P. **Estatística Aplicada à Aqüicultura**. Recife: Bagaços, 1999. 265 p.

METTING, B. Micro-algae in agriculture. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.). **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 288-304.

MOLINA GRIMA, E. et al. The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 711-719, 1995.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity. **Phycologia**, n. 35, p. 308–326, 1996.

NYBERG, H. GC-MS methods of lower plant glycolipids fatty acids. In: **Modern Methods of Plant Analysis**. New Series, v. 3. Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Berlin: Springer Verlag, 1986. p. 67-99.

OHSHIMA, T. Recovery and use of nutraceutical products from marine resources. **Foodtechnology**, v. 52, n. 6, p. 50-54, 1998.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O.; FREEMAN, D. W. Effect of CO₂ enhancement in an outdoor algal production system using *Tetraselmis* sp. **Journal of Applied Phycology**, n. 3, p. 363-366, 1991.

OLIVERA, A. **Crescimento das diatomáceas bacillariophyceae *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade**. 1993. 204 f.. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

OLIVERA, A. **Avaliação do valor nutricional das microalgas *Chaetoceros calcitrans* (PAULSEN) TAKANO e *Tetraselmis tetrahele* (KYLIN) BUTCH e do microcrustáceo *Artemia franciscana* (KELLOGG, 1906) utilizados como alimento inicial de larvas de *Penaeus paulensis* (PÉREZ FARFANTE, 1967)**. 1998. 128 f.. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

OMEGADHA. 2001. Capturado em 20 ago. 2001. Disponível na Internet <http://www.omegadha.com>.

OSWALD, W. J. Micro-algae and waste-water treatment. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 305-328.

OTERO, A. et al. Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in semicontinuous cultures of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Marine Biotechnology**, n. 3, p. 82-85, 1995.

PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. 382 p.

PERNET, F. et al. Variation of lipid class and fatty acid composition of *C. muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**, v. 221, p. 393-406, 2003.

PETERSON, D. H. et al. Phytoplankton productivity in relation to light intensity: a simple equation. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 24, p. 813-832, 1987.

PIGOTT, G. M.; TUCKER, B. W. **SEAFOOD**: effects of technology on nutrition. New York: Marcel Dekker, 1990. 362 p.

PINDICH, R., RUBENFELD, D. **Econometric models and economic forecasts**. 2 ed. New York: Mc Graw-Hill, 1981. 492 p.

POLI, C. R. et al. (orgs.). **Aqüicultura**: Experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2003. 456 p.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635–648, 2004.

RADWAN, S. S. Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for microbiological use. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 35, p. 421-430, 1991.

RATLEDGE, C. Microorganisms as source of polyunsaturated fatty acids. In: GUNSTONE, F. D. (ed.). **Structured and modified lipids**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 351-399.

RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University, 1988. p.331-356.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RENAUD, S. M. et al. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 1, p. 43-54, 1991.

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on growth and fatty acid composition of tropical australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, n. 211, p. 195-214, 2002.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 85 - 121.

RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 69-100. (a)

RICHMOND, A. Outdoor mass cultures of microalgae; biological principles, production systems. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 285-330. (b)

RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

RICHMOND, A. Biological principles of mass cultivation. In: **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 125-177.

RIVKIN, R. B. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. 1. Photosynthesis, chemical composition and growth. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 55, n. 2-3, p. 291-304, 1989.

ROBLES MEDINA, A. et al. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 13, p. 517-580, 1998.

ROUND, F.E. **Biologia das Algas**. 2 ed., Francisco Perlingeiro Neto (Trad.). Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. 263 p.

ROUSCH, J. M.; BINGHAM, S. E.; SOMMERFELD, M. R. Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 295, p. 145-156, 2003.

SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; VOLTOLINA, D. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (*Bacillariophyceae*) under different light conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107b, n. 1, p. 39-44, 1994.

SATO, N.; MURATA, N. Membrane lipids. **Methods in Enzymology**, n. 167, p. 251–259, 1988.

SCALA, S.; BOWLER, C. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. **Cellular and Molecular Life Science**, n. 58, p. 1666–1673, 2001.

SHEEHAN, J. et al. **A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program**: biodiesel from algae. US Department of Energy's, Office of Fuels development. NREL/TP-580-24190, 1998. 328 p.

SHELEF, G.; SOEDER, C. J. **Algae Biomass**: production and use. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical, 1980. 852 p.

SILVA, F. C. et al. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C. R. et al. (orgs.). **Aqüicultura**: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2003. p. 93-120.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SKULBERG, O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyta research. **Journal of Applied Phycology**, n. 12, p. 341–348, 2000.

SKULBERG, O. M. Bioactive Chemicals in Microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 485-512.

SOARES-GOMES, A.; FIGUEIREDO, A. G. O ambiente marinho. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 1-34.

SOLOMON, C. M. et al. Characterization of extracellular polymers of *Phaeocystis globosa* and *P. antarctica*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 250, p. 81-89, 2003.

SOONG, P. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. (eds.) **Algae Biomass**. Production and Use. Amsterdam: Elsevier / North Holland Biomedical, 1980. p. 97-113.

STEIN, J.R. (ed.). **Handbook of Phycological Methods**: culture methods and growth measurements. Cambridge: Cambridge University, 1973. 448 p.

SUSENIK, A.; WAHNON, R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, n. 91, p. 61-72, 1991.

SWAAF, M. E. **Docosahexaenoic acid production by the marine alga *Cryptocodinium cohnii***. 2003. 127 f.. Tese (Doutorado em Ciências) - Technische Universiteit Delft, Delft, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 249-279.

THOMPSON, P. A.; HARRISON, P. J.; WHITE, J. N. C. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 26, n. 2, p. 278-288, 1990.

THOMPSON, P. A.; GUO, M.; HARRISON, P. J. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). **Marine Biology**, v. 117, n. 2, p. 259-268, 1993.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 204. p. 3-19.

TORO, J. E. the growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. **Aquaculture and Fish Management**, n. 20, p. 249-254, 1989.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 178-214.

TRIPATHI, U. et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 197-199, 1999.

TSUZUKI, M. et al. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. **Plant Physiology**, v. 93, n. 3, p. 851-856, 1990.

TZOVENIS, I.; DE PAUW, N; SORGELOOS, P. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids. II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. **Aquaculture**, v. 216, p. 223-242, 2003.

URIBE, E. Cultivo de microalgas. In: **Curso Internacional Sobre o Cultivo de Microalgas**, 2, 1989, Coquimbo: Universidad Católica del Norte, 1989. p. 39-84.

VÍLCHEZ, C. et al. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 20, p. 562-572, 1997.

VOLKMAN, J. K. et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal of marine Biology and Ecology**, v. 128, p. 219-240, 1989.

VOLTOLINA, D. et al. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. **Aquacultural Engineering**, v. 19, p. 7-15, 1998.

VONSHAK, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 117-145.

VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Environmental stress physiology. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 57-82.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. **Biotechnology Letters**, n. 22, p. 727-733, 2000. (a).

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 25, p. 218-224, 2000. (b).

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, n. 21, v. 4, p. 273 - 294, 2003.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, n. 6, p. 87-102, 2000.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. W-3 fatty acids: alternative sources of production. **Process Biochemistry**, n. 21, p. 117-125, 1989.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2963-2967, 1991.

ZASLAVSKAIA, L. A. et al. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. **Science**, v. 292, p. 2073 - 2075, 2001.

ZITTELLI, G. C. et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 299-312, 1999.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, n. 9, p. 189-194, 1997.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 351-356, 1995.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – TABELAS DE DADOS

TABELA 1 – Valores médios e desvio padrão da densidade celular máxima (DCM), do tempo de cultivo (TEMPO) e da velocidade de crescimento (k) para cada fonte de carbono e para cada espécie.

Espécie	Fonte de carbono	DCM (cel/mL)	TEMPO (dias)	k (divisões/dia)
CMU	Controle	$729,7 \times 10^4 \pm 140,1$	$5,3 \pm 0,6$	$1,27 \pm 0,31$
CMU	Glicose	$650,0 \times 10^4 \pm 50,5$	$4,7 \pm 1,2$	$1,23 \pm 0,23$
CMU	Acetato	$690,7 \times 10^4 \pm 122,5$	$5,0 \pm 1,0$	$1,25 \pm 0,20$
CMU	CO ₂	$1406,3 \times 10^4 \pm 337,8$	$4,3 \pm 0,6$	$1,46 \pm 0,24$
TFL	Controle	$86,4 \times 10^4 \pm 16,9$	$4,7 \pm 1,2$	$1,43 \pm 0,37$
TFL	Glicose	$66,1 \times 10^4 \pm 10,1$	$4,3 \pm 0,6$	$1,51 \pm 0,10$
TFL	Acetato	$99,6 \times 10^4 \pm 8,7$	$4,3 \pm 0,6$	$1,32 \pm 0,14$
TFL	CO ₂	$104,0 \times 10^4 \pm 26,9$	$4,0 \pm 0,0$	$1,66 \pm 0,03$

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

TABELA 2 – Valores médios e desvio padrão da biomassa seca (em mg/L de cultura) para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	Fase	Fonte de carbono	Biomassa (mg/L)
CMU	Exponencial	Controle	$715,9 \pm 35,0$
	Estacionária		$811,9 \pm 91,4$
	Exponencial	Glicose	$507,7 \pm 87,5$
	Estacionária		$922,4 \pm 120,5$
	Exponencial	Acetato	$573,5 \pm 45,2$
	Estacionária		$632,3 \pm 21,7$
	Exponencial	CO ₂	$987,7 \pm 96,8$
	Estacionária		$1142,5 \pm 131,1$
TFL	Exponencial	Controle	$436,0 \pm 53,1$
	Estacionária		$857,7 \pm 125,4$
	Exponencial	Glicose	$476,7 \pm 93,3$
	Estacionária		$638,6 \pm 86,3$
	Exponencial	Acetato	$564,7 \pm 27,2$
	Estacionária		$803,5 \pm 150,5$
	Exponencial	CO ₂	$538,5 \pm 87,3$
	Estacionária		$899,3 \pm 140,4$

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

TABELA 3 – Valores médios e desvio padrão de proteínas hidrossolúveis (em mg/g da biomassa seca) para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	Fase	Fonte de carbono	Proteínas (mg/g)
CMU	Exponencial	Controle	274,1 ± 38,8
	Estacionária		208,0 ± 22,8
	Exponencial	Glicose	325,0 ± 54,1
	Estacionária		299,0 ± 50,0
	Exponencial	Acetato	316,3 ± 47,0
	Estacionária		240,5 ± 53,5
	Exponencial	CO ₂	307,7 ± 37,0
	Estacionária		341,3 ± 35,2
TFL	Exponencial	Controle	239,4 ± 29,3
	Estacionária		301,2 ± 46,0
	Exponencial	Glicose	317,4 ± 35,8
	Estacionária		320,7 ± 10,4
	Exponencial	Acetato	329,3 ± 9,9
	Estacionária		332,6 ± 11,4
	Exponencial	CO ₂	421,4 ± 9,9
	Estacionária		443,1 ± 52,9

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

TABELA 4 – Valores médios e desvio padrão de carboidratos totais (em mg/g da biomassa seca) para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	Fase	Fonte de carbono	Carboidratos (mg/g)
CMU	Exponencial	Controle	183,8 ± 31,3
	Estacionária		149,3 ± 16,4
	Exponencial	Glicose	192,3 ± 17,7
	Estacionária		185,1 ± 26,3
	Exponencial	Acetato	96,9 ± 5,4
	Estacionária		142,2 ± 19,1
	Exponencial	CO ₂	247,6 ± 8,4
	Estacionária		231,0 ± 20,6
TFL	Exponencial	Controle	177,1 ± 4,4
	Estacionária		236,8 ± 18,1
	Exponencial	Glicose	186,0 ± 22,5
	Estacionária		191,2 ± 8,7
	Exponencial	Acetato	127,9 ± 9,6
	Estacionária		182,2 ± 14,7
	Exponencial	CO ₂	124,3 ± 25,5
	Estacionária		103,0 ± 5,3

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

TABELA 5 – Valores médios e desvio padrão de lipídios totais (em mg/g da biomassa seca para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	Fase	Fonte de carbono	Lipídios (mg/g)
CMU	Exponencial	Controle	88,3 ± 17,8
	Estacionária		106,6 ± 12,2
	Exponencial	Glicose	101,5 ± 18,1
	Estacionária		156,5 ± 18,5
	Exponencial	Acetato	74,8 ± 7,2
	Estacionária		66,1 ± 8,0
	Exponencial	CO ₂	122,6 ± 10,4
	Estacionária		179,3 ± 26,0
TFL	Exponencial	Controle	95,0 ± 10,7
	Estacionária		173,6 ± 28,5
	Exponencial	Glicose	69,0 ± 7,2
	Estacionária		169,0 ± 14,5
	Exponencial	Acetato	40,1 ± 5,9
	Estacionária		66,7 ± 9,7
	Exponencial	CO ₂	171,6 ± 21,9
	Estacionária		230,5 ± 7,8

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

TABELA 6 – Valores médios de EPA (em µg/mg da biomassa seca) para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	Fase	Fonte de carbono	EPA (µg/mg)
CMU	Exponencial	Controle	8,4 ± 0,1
	Estacionária		6,0 ± 0,5
	Exponencial	Glicose	3,8 ± 0,2
	Estacionária		14,8 ± 2,5
	Exponencial	Acetato	5,4 ± 0,6
	Estacionária		13,7 ± 1,6
	Exponencial	CO ₂	9,8 ± 0,6
	Estacionária		16,4 ± 2,0
TFL	Exponencial	Controle	17,2 ± 2,1
	Estacionária		32,4 ± 1,2
	Exponencial	Glicose	25,2 ± 2,5
	Estacionária		33,7 ± 2,0
	Exponencial	Acetato	27,4 ± 0,7
	Estacionária		33,5 ± 3,4
	Exponencial	CO ₂	19,8 ± 0,4
	Estacionária		35,9 ± 2,5

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

TABELA 7 – Valores médios e desvio padrão de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) para cada espécie, para cada fase da curva de crescimento e para cada fonte de carbono.

Espécie	Fase	Fonte de carbono	DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
CMU	Exponencial	Controle	$0,8 \pm 0,1$
	Estacionária		$0,9 \pm 0,1$
	Exponencial	Glicose	$0,5 \pm 0,1$
	Estacionária		$2,7 \pm 0,6$
	Exponencial	Acetato	$1,0 \pm 0,2$
	Estacionária		$2,8 \pm 0,1$
	Exponencial	CO_2	$1,3 \pm 0,1$
	Estacionária		$2,2 \pm 0,2$
TFL	Exponencial	Controle	$3,5 \pm 0,8$
	Estacionária		$8,2 \pm 1,5$
	Exponencial	Glicose	$6,3 \pm 1,0$
	Estacionária		$8,2 \pm 1,6$
	Exponencial	Acetato	$8,9 \pm 1,1$
	Estacionária		$10,8 \pm 1,8$
	Exponencial	CO_2	$9,5 \pm 1,2$
	Estacionária		$12,4 \pm 1,4$

CMU = *Chaetoceros muelleri*, TFL = *Thalassiosira fluviatilis*.

8.2 ANEXO 2 - ANOVA DOS DEMAIS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

8.2.1 Ácido 16:2 n-6

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 16:2 n-6 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,16125	0,08063	1,2920
Fator 1 (espécie)	1	0,38521	0,38521	6,1729*
Fator 2 (fase)	1	0,42188	0,42188	6,7605*
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,50063	0,16688	2,6742
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,22688	0,22688	3,6357
Fator 1 x Fator 3	3	0,95896	0,31965	5,1224**
Fator 2 x Fator 3	3	0,01229	0,00410	0,0657*
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	0,29396	0,09799	1,5702
Resíduo	30	1,87208	0,06240	
Total	47	4,83313		

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CMU	0,91	a
TFL	0,73	b

Diferença Mínima Significativa: 0,15.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Exponencial	0,73	a
Estacionária	0,91	b

Diferença Mínima Significativa: 0,15.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x Controle	1,07	a
TFL x Acetato	1,07	a
CMU x CO ₂	1,00	a b
TFL x Glicose	0,80	a b
CMU x Controle	0,78	a b
TFL x CO ₂	0,70	b
CMU x Acetato	0,63	b
CMU x Glicose	0,50	b

Diferença Mínima Significativa: 0,34.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase e fonte de carbono.

Interação	16:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
Estacionária x Controle	1,00	a	
Estacionária x CO ₂	0,97	a	
Estacionária x Acetato	0,95	a	
Exponencial x Controle	0,85	a	b
Exponencial x Acetato	0,75	a	b
Exponencial x CO ₂	0,73	a	b
Estacionária x Glicose	0,73	a	b
Exponencial x Glicose	0,57		b

Diferença Mínima Significativa: 0,34.

8.1.2 Ácido 16:2 n-4

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 16:2 n-4 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,16125	0,08062	0,4937
Fator 1 (espécie)	1	50,63521	50,63521	310,0906**
Fator 2 (fase)	1	3,05021	3,05021	18,6795
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,85563	0,28521	1,7466
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,28521	0,28521	1,7466
Fator 1 x Fator 3	3	2,99562	0,99854	6,1151**
Fator 2 x Fator 3	3	0,92062	0,30687	1,8793
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	0,50563	0,16854	1,0322
Resíduo	30	4,89875	0,16329	
Total	47	64,30813		

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	16:2 n-4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
TFL	2,82	a	
CMU	0,77		b

Diferença Mínima Significativa: 0,24.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	16:2 n-4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
Estacionária	2,05	a	
Exponencial	1,54		b

Diferença Mínima Significativa: 0,24.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:2 n-4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	16:2 n-4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
TFL x Acetato	3,32	a		
TFL x Controle	2,85	a	b	
TFL x Glicose	2,58	b		
TFL x CO ₂	2,53	b		
CMU x CO ₂	1,20	c		
CMU x Controle	0,68	c		d
CMU x Glicose	0,60	d		
CMU x Acetato	0,58	b	d	

Diferença Mínima Significativa: 0,56.

8.1.3 Ácido 16:3

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 16:3 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	4,61167	2,30583	2,6175
Fator 1 (espécie)	1	433,20083	433,20083	491,7459**
Fator 2 (fase)	1	70,08333	70,08333	79,5548**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	9,70917	3,23639	3,6738*
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	30,72000	30,72000	34,8717**
Fator 1 x Fator 3	3	11,90917	3,96972	4,5062*
Fator 2 x Fator 3	3	23,15667	7,71889	8,7621**
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	26,64000	8,88000	10,0801**
Resíduo	30	26,42833	0,88094	
Total	47	636,45917		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
TFL	7,48	a	
CMU	1,47	b	

Diferença Mínima Significativa: 0,55.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
Estacionária	5,69	a	
Exponencial	3,27	b	

Diferença Mínima Significativa: 0,55.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono.

Fonte de carbono	16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos	
Glicose	5,02	a	
CO ₂	4,82	a	b
Acetato	4,15	a	b
Controle	3,93		b

Diferença Mínima Significativa: 1,04.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase.

Interação	16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
TFL x Estacionária	9,49	a		
CMU x Estacionária	5,47		b	
CMU x Exponencial	1,88			c
TFL x Exponencial	1,07			d

Diferença Mínima Significativa: 0,78.

Tabela 6 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
TFL x Glicose	8,85	a		
TFL x CO ₂	7,58	a	b	
TFL x Acetato	7,05		b	
TFL x Controle	6,45		b	
CMU x CO ₂	2,05			c
CMU x Controle	1,42			c
CMU x Acetato	1,25			c
CMU x Glicose	1,18			c

Diferença Mínima Significativa: 1,29.

Tabela 7 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase e fonte de carbono.

Interação	16:3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
Estacionária x Controle	6,22	a		
Estacionária x Glicose	6,03	a		
Estacionária x CO ₂	6,00	a		
Estacionária x Acetato	4,50		b	
Exponencial x Glicose	4,00		b	
Exponencial x Acetato	3,80		b	
Exponencial x CO ₂	3,63		b	
Exponencial x Controle	1,65			c

Diferença Mínima Significativa: 1,29.

8.1.3 Ácido 18:2 n-8

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 18:2 n-8 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,04500	0,02250	1,8000
Fator 1 (espécie)	1	0,36750	0,36750	29,4000**
Fator 2 (fase)	1	0,04083	0,04083	3,2667
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,01417	0,00472	0,3778
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,04083	0,04083	3,2667
Fator 1 x Fator 3	3	0,01417	0,00472	0,3778
Fator 2 x Fator 3	3	0,09750	0,03250	2,6000
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	0,09750	0,03250	2,6000
Resíduo	30	0,3750	0,01250	
Total	47	1,09250		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-8 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	18:2 n-8 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL	7,48	a
CMU	0,00	b

Ácido graxo poliinsaturado presente somente em *T. fluviatilis*.

8.1.3 Ácido 18:2 n-6

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 18:2 n-6 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,34125	0,17063	2,7838
Fator 1 (espécie)	1	6,16333	6,16333	100,5574**
Fator 2 (fase)	1	0,52083	0,52083	8,4976**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,40500	0,13500	2,2026
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,36750	0,36750	5,9959*
Fator 1 x Fator 3	3	0,54500	0,18167	2,9640*
Fator 2 x Fator 3	3	0,15750	0,05250	0,8566
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	0,13083	0,04361	0,7115
Resíduo	30	1,83875	0,06129	
Total	47	10,47000		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL	0,83	a
CMU	0,12	b

Diferença Mínima Significativa: 0,15.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	0,58	a
Exponencial	0,37	b

Diferença Mínima Significativa: 0,15.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase.

Interação	18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x Estacionária	1,02	a
TFL x Exponencial	0,64	b
CMU x Estacionária	0,13	c
CMU x Exponencial	0,10	c

Diferença Mínima Significativa: 0,21.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	18:2 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x CO_2	1,08	a
TFL x Controle	0,93	a
TFL x Glicose	0,77	a b
TFL x Acetato	0,55	b
CMU x Acetato	0,13	c
CMU x CO_2	0,13	c
CMU x Controle	0,10	c
CMU x Glicose	0,10	c

Diferença Mínima Significativa: 0,34.

8.1.3 Ácido 18:2 n-3

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 18:2 n-3 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,25542	0,12771	1,3925
Fator 1 (espécie)	1	18,25333	18,25333	199,0368**
Fator 2 (fase)	1	0,27000	0,27000	2,9441
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,91500	0,30500	3,3258*
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,27000	0,27000	2,9441
Fator 1 x Fator 3	3	0,91500	0,30500	3,3258
Fator 2 x Fator 3	3	0,97833	0,32611	3,5560*
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	0,97833	0,32611	3,5560
Resíduo	30	2,75125	0,09171	
Total	47	25,58667		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CMU	1,23	a
TFL	0,00	b

Ácido graxo poliinsaturado presente somente em *C. muelleri*.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono.

Fonte de carbono	18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Glicose	0,74	a
CO ₂	0,71	a b
Acetato	0,62	a b
Controle	0,39	b

Diferença Mínima Significativa: 0,34.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
CMU x Glicose	1,48	a		
CMU x CO ₂	1,43	a		
CMU x Acetato	1,23	a		
CMU x Controle	0,78		b	
TFL x Controle	0,00			c
TFL x Glicose	0,00			c
TFL x Acetato	0,00			c
TFL x CO ₂	0,00			c

Diferença Mínima Significativa: 0,42.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase e fonte de carbono.

Interação	18:2 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
Estacionária x CO ₂	0,90	a		
Estacionária x Glicose	0,83	a		
Exponencial x CO ₂	0,80	a	b	
Estacionária x Controle	0,63	a	b	c
Exponencial x Controle	0,58	a	b	c
Exponencial x Glicose	0,55	a	b	c
Estacionária x Acetato	0,40		b	c
Exponencial x Acetato	0,23			c

Diferença Mínima Significativa: 0,42.

8.1.3 Ácido 18:3 n-6

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 18:3 n-6 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,18042	0,09021	0,5816
Fator 1 (espécie)	1	44,08333	44,08333	284,2303**
Fator 2 (fase)	1	1,20333	1,20333	7,7586
Fator 3 (fonte de carbono)	3	5,97167	1,99056	12,8342**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	1,20333	1,20333	7,7586**
Fator 1 x Fator 3	3	5,97167	1,99056	12,8342**
Fator 2 x Fator 3	3	3,10500	1,03500	6,6732**
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	3,10500	1,03500	6,6732
Resíduo	30	4,65292	0,15510	
Total	47	69,47667		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CMU	1,92	a
TFL	0,00	b

Ácido graxo poliinsaturado presente somente em *C. muelleri*.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	1,12	a
Exponencial	0,80	b

Diferença Mínima Significativa: 0,23.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono.

Fonte de carbono	18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Acetato	1,38	a
CO ₂	1,17	a b
Glicose	0,82	b c
Controle	0,46	c

Diferença Mínima Significativa: 0,44.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase.

Interação	18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CMU x Estacionária	2,23	a
CMU x Exponencial	1,60	b
TFL x Exponencial	0,00	c
TFL x Estacionária	0,00	c

Diferença Mínima Significativa: 0,33.

Tabela 6 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CMU x Acetato	2,77	a
CMU x CO ₂	2,35	a
CMU x Glicose	1,63	b
CMU x Controle	0,92	b
TFL x Controle	0,00	c
TFL x Glicose	0,00	c
TFL x Acetato	0,00	c
TFL x CO ₂	0,00	c

Diferença Mínima Significativa: 0,54.

Tabela 7 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase e fonte de carbono.

Interação	18:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária x CO ₂	1,80	a
Estacionária x Glicose	1,47	a b
Exponencial x CO ₂	1,00	b c
Estacionária x Controle	0,97	b c
Exponencial x Controle	0,88	c
Exponencial x Glicose	0,72	c
Estacionária x Acetato	0,63	c d
Exponencial x Acetato	0,20	d

Diferença Mínima Significativa: 0,54.

8.1.3 Ácido 18:3 n-3

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 18:3 n-3 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,07125	0,03563	0,6304
Fator 1 (espécie)	1	3,15188	3,15188	55,7717**
Fator 2 (fase)	1	0,00188	0,00188	0,0332
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,61229	0,20410	3,6115*
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,01021	0,01021	0,1806
Fator 1 x Fator 3	3	0,70896	0,23632	4,1816*
Fator 2 x Fator 3	3	1,55229	0,51743	9,1558**
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	1,18396	0,39465	6,9833**
Resíduo	30	1,69542	0,05651	
Total	47	8,98813		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL	0,55	a
CMU	0,04	b

Diferença Mínima Significativa: 0,14.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono.

Fonte de carbono	18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
Controle	0,45	a		
CO ₂	0,33	a	b	
Acetato	0,25	a	b	
Glicose	0,14	b		

Diferença Mínima Significativa: 0,14.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos			
TFL x Controle	0,88	a			
TFL x CO ₂	0,60	a	b		
TFL x Acetato	0,48		b	c	
TFL x Glicose	0,23			c	d
CMU x CO ₂	0,07				d
CMU x Glicose	0,05				d
CMU x Controle	0,02				d
CMU x Acetato	0,02				d

Diferença Mínima Significativa: 0,26.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase e fonte de carbono.

Interação	18:3 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
Exponencial x Controle	0,73	a		
Estacionária x CO ₂	0,52	a	b	
Estacionária x Glicose	0,27		b	c
Estacionária x Controle	0,25		b	c
Estacionária x Acetato	0,25		b	c
Exponencial x Glicose	0,17			c
Exponencial x CO ₂	0,15			c
Exponencial x Acetato	0,02			c

Diferença Mínima Significativa: 0,33.

8.1.3 Ácido 18:4 n-3

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 18:4 n-3 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	1,22792	0,61396	0,7214
Fator 1 (espécie)	1	268,85333	268,85333	315,9006**
Fator 2 (fase)	1	161,33333	161,33333	189,5654**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	33,21417	11,07139	13,0088**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	111,02083	111,02083	130,4486
Fator 1 x Fator 3	3	38,99500	12,99833	15,2729**
Fator 2 x Fator 3	3	2,33833	0,77944	0,9158
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	16,18417	5,39472	6,3388**
Resíduo	30	25,53208	0,85107	
Total	47	658,69917		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL	6,22	a
CMU	1,49	b

Diferença Mínima Significativa: 0,54.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	5,69	a
Exponencial	2,02	b

Diferença Mínima Significativa: 0,54.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono.

Fonte de carbono	18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CO ₂	5,06	a
Glicose	4,09	a b
Acetato	3,47	b d
Controle	2,80	d

Diferença Mínima Significativa: 1,02.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase.

Interação	18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
TFL x Estacionária	9,57	a		
TFL x Exponencial	2,87		b	
CMU x Estacionária	1,80			c d
CMU x Exponencial	1,17			d

Diferença Mínima Significativa: 0,77.

Tabela 6 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fonte de carbono.

Interação	18:4 n-3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos		
TFL x CO ₂	8,65	a		
TFL x Glicose	6,80		b	
TFL x Controle	4,83			c
TFL x Acetato	4,60			c
CMU x Acetato	2,33			d
CMU x CO ₂	1,47			d e
CMU x Glicose	1,38			d e
CMU x Controle	0,77			e

Diferença Mínima Significativa: 1,27.

8.1.3 Ácido 20:3 n-6

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 20:3 n-6 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,03042	0,01521	0,4112
Fator 1 (espécie)	1	0,04083	0,04083	1,1040
Fator 2 (fase)	1	0,21333	0,21333	5,7679*
Fator 3 (fonte de carbono)	3	0,26750	0,08917	2,4108
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	0,01333	0,01333	0,3605
Fator 1 x Fator 3	3	0,26750	0,08917	2,4108
Fator 2 x Fator 3	3	0,04500	0,01500	0,4056
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	0,05167	0,01722	0,4656
Resíduo	30	1,10958	0,03699	
Total	47	2,03917		

GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 20:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	20:3 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	0,24	a
Exponencial	0,10	b

Diferença Mínima Significativa: 0,11.

8.1.3 Ácido 20:4 n-6

Tabela 1 – ANOVA fatorial para o conteúdo do ácido 20:4 n-6 na biomassa seca.

Causa da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	0,59542	0,29771	1,7204
Fator 1 (espécie)	1	8,67000	8,67000	50,1035**
Fator 2 (fase)	1	3,96750	3,96750	22,9280**
Fator 3 (fonte de carbono)	3	14,13750	4,71250	27,2333**
Interações				
Fator 1 x Fator 2	1	6,75000	6,75000	39,0079**
Fator 1 x Fator 3	3	0,18833	0,06278	0,3628
Fator 2 x Fator 3	3	6,48417	2,16139	12,4906**
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3	3	2,1750	0,72500	4,1897
Resíduo	30	5,19125	0,17304	
Total	47	48,15917		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: calculado; *: diferença significativa com $p < 0,05$; **: diferença significativa com $p < 0,01$.

Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as espécies.

Espécie	20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CMU	1,83	a
TFL	0,98	b

Diferença Mínima Significativa: 0,24.

Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fases da curva de crescimento.

Fase	20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária	1,69	a
Exponencial	1,12	b

Diferença Mínima Significativa: 0,24.

Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) entre as fontes de carbono.

Fonte de carbono	20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
CO ₂	2,29	a
Acetato	1,40	b
Glicose	0,97	b
Controle	0,95	b

Diferença Mínima Significativa: 0,46.

Tabela 5 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre espécie e fase.

Interação	20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
TFL x Estacionária	2,49	a
CMU x Estacionária	1,17	b
CMU x Exponencial	1,07	b
TFL x Exponencial	0,89	b

Diferença Mínima Significativa: 0,34.

Tabela 6 – Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) para o ácido 20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da biomassa seca) da interação entre fase e fonte de carbono.

Interação	20:4 n-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Grupos homogêneos
Estacionária x CO ₂	3,12	a
Estacionária x Acetato	1,58	b
Exponencial x CO ₂	1,47	b
Estacionária x Glicose	1,32	b
Exponencial x Acetato	1,22	b
Exponencial x Controle	1,15	b c
Estacionária x Controle	0,75	c
Exponencial x Glicose	0,63	c

Diferença Mínima Significativa: 0,57.