



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

GEORGE MARTINS DA CUNHA

EFEITO DO PERCENTUAL DE COLHEITA DAS MICROALGAS
Isochrysis aff. galbana E *Pavlova lutheri* EM SISTEMA SEMICONTÍNUO

FLORIANÓPOLIS

2019

George Martins da Cunha

EFEITO DO PERCENTUAL DE COLHEITA DAS MICROALGAS
***Isochrysis aff. galbana* E *Pavlova lutheri* EM SISTEMA SEMICONTÍNUO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura.
Orientador: Prof. Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, George Martins da
Efeito do percentual de colheita das microalgas
Isochrysis aff. galbana e *Pavlova lutheri* em sistema
semicontínuo / George Martins da Cunha ; orientador,
Claudio Manoel Rodrigues de Melo, 2019.
55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Produção de microalgas. 3. Peso seco
de microalga. 4. Análise bromatológica. I. Melo, Claudio
Manoel Rodrigues de. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III.
Título.

George Martins da Cunha

**Efeito do percentual de colheita das microalgas *Isochrysis aff. galbana* e *Pavlova lutheri*
em sistema semicontínuo**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Felipe Matarazzo Suplicy, Dr.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)

Prof. Juliano de Déa Lindner, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Prof. Dra. Leila Hayashi

Coordenador do Programa

Prof. Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo

Orientador

Florianópolis, 29 de agosto de 2017.

Dedico esta conquista a minha família, primeiramente a sanguínea, em especial a minha mãe e depois as demais famílias que vamos formando com nossa vivência!

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família, especialmente a minha mãe, Maria Madalena, que sempre me apoiou em todos os momentos e situações adversas encontradas nesta caminhada.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em conjunto com o Programa de Pós-graduação em Aquicultura por ter propiciado esta oportunidade de aprendizado.

Aos professores Claudio Manoel Rodrigues de Melo e Gilberto J. P. Onofre de Andrade pela orientação e coorientação deste estudo.

Aos amigos, ou melhor, a família do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) pelo meu recebimento na equipe e todos os ensinamentos e ajuda a qual sempre estiveram dispostos a fornecer, especialmente a Jaqueline Araújo (Jaque), que me acompanhou de perto em toda a realização do cultivo e também as “meninas das microalgas” Juliana Granzoti (Ju), Gabrielly Campos (Gabi), Giulia Pereira (Giu) e Juliana Portela (Ju) além do amigo Adenilson Nunes (Sino) e a Simone Sühnel pelo importante papel de “segunda coorientadora”.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Cultivo de Algas (LCA) e de Camarões Marinhos (LCM) por ter cedido espaço e apoio para realização de processos importantes dos experimentos, bem como a troca de ideias sobre o tema especialmente com o professor Roberto Bianchini Derner e Rafael Garcia Lopes.

Ao professor César Damian, a Giseli Olivo e demais amigos e colegas do Laboratório de Análises Físico Química (LABCAL) onde foi realizado parte importante deste estudo.

Aos amigos, especialmente ao Robinsom Akishino e Graziela C. Vieira, e demais colegas que acompanharam de perto toda essa jornada, além dos amigos da OneUP e [BRA], mesmo não presentes, que auxiliaram em muito.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A escalada pode ser longa...

Mas a vista vale a pena!

- Taric, o Escudo de Valoran”

Autor Desconhecido

RESUMO

Microalgas flageladas como *Isochrysis galbana* (ISO) e *Pavlova lutheri* (PAV) são umas das espécies produzidas nos *hatcheries* para alimentação de moluscos bivalves. Neste estudo foi avaliado os efeitos de diferentes percentuais de colheita (30, 50 e 70%), em sistema semicontínuo, sobre a produtividade e a composição química destas microalgas em comparação ao sistema de cultivo estático alimentado. Foram utilizadas 15 garrafas de vidro (10.000 mL), onde iniciou-se com 225 mL (2,5%) de inoculo (Guillard f/2) em 8.775 mL de água salgada contendo meio Conway (1 mL.L⁻¹). A colheita no sistema semicontínuo foi realizada a cada 4 dias. Após a colheita, o volume coletado foi repostado com água salgada e meio Conway. Ao sistema estático alimentado foi adicionado meio Conway (1 mL.L⁻¹) a cada 4 dias e as colheitas foram realizadas no 12º e 24º dia de cultivo. Utilizou-se água a 24±1°C e foto período de 24 h. A contagem celular foi realizada diariamente e o experimento teve duração de 24 dias. Observaram-se diferenças (p<0,05) na densidade celular entre os tratamentos do semicontínuo a partir do 4º dia. A microalga *I. galbana* entrou em sua fase de estabilidade de crescimento a partir do 9º dia, o que não ocorreu com a *P. lutheri* que apresentou valores crescente ao longo do cultivo. A maior densidade celular para a microalga ISO nos tratamentos do semicontínuo ocorreu no 8º dia, alcançando 1.411,46±99,82, 1.344,79±71,69 e 1.144,79±51,76 x10⁴ células.mL⁻¹ para os percentuais de colheita 30, 50 e 70% respectivamente. Para PAV a maior densidade celular ocorreu no 24º dia de cultivo para todos os tratamentos com 1.776,04±102,76, 1.581,25±76,03 e 1.242,71±109,39 x10⁴ células.mL⁻¹ para os percentuais de colheita 30, 50 e 70%, respectivamente. A produção de biomassa seca do sistema semicontínuo não apresentou diferenças (p<0,05) em relação ao sistema estático alimentado no 12º dia de cultivo (T12) para a ISO. Já em T24 para ISO e no cultivo da PAV os tratamentos do sistema estático alimentado apresentaram valores maiores de produção. Os tratamentos não apresentaram diferenças na composição química das microalgas ao longo dos cultivos.

Palavras-chave: Aquicultura. Produção de microalgas. Peso seco de microalga. Análise bromatológica.

ABSTRACT

The flagellated microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* (ISO) and *Pavlova lutheri* (PAV) are common species produced in hatcheries to feed bivalve molluscs. In this study, we evaluated the resilient productivity effect of different harvest rate (30, 50, 70%) in semi-continuous (SC) compared to a control static system (STA). Fifteen glass bottles (10,000 mL) were used, starting with 225 mL (2.5%) inoculum (Guillard f / 2) in 8,775 mL of saltwater containing Conway (1 mL.L⁻¹). Experimental units maintained water temperature at 24±1° C and a 24h photo period. Harvest in SC was performed every 4 days, with a posterior reestablishment of saltwater and Conway volume. While, in STA, Conway (1 mL.L⁻¹) was added every 4 days and harvest events were performed on the 12th and 24th day of cultivation. Cell counts were performed daily during the 24 days of experiment. Differences (p <0.05) in cell density were observed between SC treatments from day 4 on. ISO stabilized its growth from the 9th day on, while PAV demonstrated an increasing density growth throughout the experiment period. The highest cell density for ISO in SC treatments occurred at the 8th day, reaching 1,411.46±99.82, 1,344.79±71.69 and 1,144.79±51.76 x10⁴ cells.mL⁻¹ for harvest rate of 30, 50 and 70%, respectively. For PAV, highest density occurred on the 24th day of cultivation for all SC treatments, exhibiting a 1,776.04±102.76, 1,582.25±76.03 and 1,242.71±109.39 x10⁴ cells.mL⁻¹ at harvest rate 30, 50 and 70%, respectively. The dry biomass production showed differences (p <0.05) only at 24th day of cultivation, in which STA presented highest production values for both ISO and PAV. No differences in the chemical composition of microalgae throughout the experiment was perceived.

Keywords: Aquaculture. Microalgae production. Dry weight of microalgae. Bromatological analysis.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** – Curva característica de crescimento de microalgas em sistema estático 17
- Figura 2** – Curva característica de crescimento de microalgas em sistema semicontínuo 20

ARTIGO

- Figura 1** – Exemplo das UE utilizadas para o cultivo, em sistema semicontínuo, estático, e detalhamento da tampa de 3 vias 27
- Figura 2** – Densidade celular média (\pm SD) da microalga *Isochrysis* aff. *galbana* nos dias de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado 33
- Figura 3** - Densidade celular média (\pm SD) da microalga *Pavlova lutheri* nos dias de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado 35
- Figura 4** – Produção de biomassa seca média (\pm SD) da microalga *Isochrysis* aff. *galbana* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado 36
- Figura 5** – Produção de biomassa seca média (\pm SD) da microalga *Pavlova lutheri* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado .. 37
- Figura 6** – Peso seco por celular médio (\pm SD) da microalga *Isochrysis* aff. *galbana* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado . 38
- Figura 7** - Peso seco por celular médio (\pm SD) da microalga *Pavlova lutheri* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30%, 50% e 70%) e do estático alimentado 38

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 – Lista das espécies de microalgas mais utilizadas na malacocultura	15
Tabela 2 – Faixa de temperatura, luminosidade e salinidade para a produção de microalgas	16
Tabela 3 – Composição dos meios de cultura Guillard F/2, Conway e Algal1	16
Tabela 4 – Composição química de algumas microalgas utilizadas na aquicultura, percentuais médios de carboidratos (C%), lipídeos (L%) e proteínas (P%)	21

ARTIGO

Tabela 1 – Percentuais médios (%) (\pm SD) de proteínas totais, carboidratos totais e lipídeos totais das microalgas <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> e <i>Pavlova lutheri</i> nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ISO *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO; CCMP 1324);

PAV *Pavlova lutheri* (PAV; CCMP 1325);

UE Unidade experimental;

P_r Produção em biomassa seca (mg.L⁻¹);

P_s Peso seco (g);

V_c Volume de cultura centrifugada (L);

P_c Peso seco por célula (pg);

d_c Densidade celular (x10⁴ células.mL⁻¹);

PAR Radiação fotossinteticamente ativa.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1.	AQUICULTURA E A DEMANDA POR ALIMENTO	13
1.2.	AS MICROALGAS	14
1.3.	CRESCIMENTO DA MICROALGAS	15
1.4.	CULTIVO DE MICROALGAS	18
1.4.1.	Sistema estático ou de batelada (bath)	19
1.4.2.	Sistema contínuo	19
1.4.3.	Sistema semicontínuo	19
1.5.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS	20
1.6.	<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> e <i>Pavlova lutheri</i>	21
1.7.	HIPÓTESE	23
1.8.	OBJETIVO	23
2.	ARTIGO CIENTÍFICO	24
2.1.	INTRODUÇÃO	25
2.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.2.1.	Quantificação da presença/ausência de <i>Vibrio</i> sp.	29
2.2.2.	Obtenção de biomassa liofilizada	29
2.2.3.	Análise bromatológica	30
2.2.4.	Análise estatística	31
2.3.	RESULTADOS	31
2.3.1.	Densidade celular	31
2.3.2.	Produção de biomassa seca	36
2.3.3.	Peso seco celular	37
2.3.4.	Proteínas, lipídeos e carboidratos totais	38
2.4.	DISCUSSÃO	40
2.4.1.	Densidade celular	40
2.4.2.	Produção de biomassa seca	41
2.4.3.	Peso seco celular	42
2.4.4.	Proteínas, lipídeos e carboidratos totais	43
2.5.	CONCLUSÕES	46
2.6.	REFERÊNCIAS DO ARTIGO	47
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
4.	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. AQUICULTURA E A DEMANDA POR ALIMENTO

A população humana tem aumentado no último século de forma rápida e estima-se que a população mundial atingirá mais de 9,7 bilhões de indivíduos em 2050. Para manter esta população é necessário suprir a sua demanda por alimento, sendo importante o desenvolvimento da área de produção de alimentos (FAO, 2016).

A pesca mundial contribui em suprir esta demanda de alimentos, porém, desde meados da década de 80 sua produção tem-se mantido estável, entorno de 90 milhões de toneladas por ano, já a aquicultura vem se desenvolvendo ao logo das décadas com os avanços tecnológicos e com a expansão dos seus cultivos, sendo que no ano de 2014 atingiu uma produção de 73,8 milhões de toneladas (FAO, 2016).

A produção aquícola brasileira, em 2014, alcançou 562,5 mil toneladas, sendo maior a produção de peixes de águas continentais (474,3 mil toneladas) seguida por crustáceos (65,1 mil toneladas) e moluscos (22,1 mil toneladas) (FAO, 2016).

O maior produtor nacional de molusco em 2014 foi o estado de Santa Catarina que produziu 21,6 mil toneladas, representando 98% do total (IBGE, 2016). Florianópolis, também no mesmo ano, foi o maior produtor de sementes de ostras, mexilhões e vieiras, sendo responsável por 88,2% do fornecimento destas para a cadeia da malacocultura nacional (IBGE, 2016).

Em 2015, os mais de 500 maricultores catarinenses produziram 20,4 toneladas de moluscos, o que representou uma movimentação financeira acima de 78 milhões de reais (EPAGRI, 2016).

Este desenvolvimento da malacocultura catarinense se iniciou na década de 90 através de avanços nas técnicas de cultivo e a disponibilidade de sementes de ostras produzidas pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal da Santa Catarina (EPAGRI, 2016).

Para a produção destes moluscos (ostras e vieiras) em laboratório faz-se necessário a manutenção de reprodutores, larvas, pré-sementes e sementes, onde são alimentados com microalgas, sua principal fonte de alimento (SILVA et al., 2004).

Nos laboratórios de produção aquícolas, a produção de biomassa de microalgas usada na alimentação dos cultivos pode representar uma grande parte dos custos de produção,

chegando até 85% do total, o que demanda uma grande atenção na produção destas microalgas. (BENEMANN, 1992; BOROWITZKA, 1997).

1.2. AS MICROALGAS

As microalgas são organismos que vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos e possuem uma infinidade de formatos e tamanhos, sendo consideradas as formas de vidas primitivas do nosso planeta e a base da cadeia alimentar dos organismos aquáticos, além de fazerem parte do fitoplâncton e fundamentais em processos biológicos e ecológicos (DERNER et al., 2006; LOURENÇO, 2006; BRENANN; OWENDE, 2010; MAITY et al., 2014).

Em sua maioria, as microalgas são organismos fotossintéticos, responsáveis por mais de 90% da fotossíntese realizada nos mares, através da combinação de água, dióxido de carbono e luz solar, resultando em energia, que é utilizada na produção biomassa (proteína, lipídeos, carboidratos e outros compostos) (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007).

Estes organismos podem não apresentar diferenciação celular interna (procaríotos), como as cianobactérias, que não possuem organelas internas como complexo de Golgi, mitocôndrias e outros, além de não terem também a cariomembrana, deixando o seu conteúdo genético (DNA) livre no citoplasma (MAITY et al., 2014).

Outras microalgas já possuem uma organização celular maior, tendo diversas organelas, inclusive os cloroplastos com diferentes pigmentos, os quais as diferenciam em alguns grupos como as Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas), Ochrophyta (algas pardas), além de outros e muitos subgrupos que levam em conta a forma e outros aspectos físicos destes organismos, como a presença de frústulas de sílica, no caso das diatomáceas, número de flagelos e outras características (LOURENÇO, 2006; BRENANN; OWENDE, 2010).

Além da variedade de forma e tamanho, as microalgas produzem pigmentos e outras substâncias importantes, sendo exploradas industrialmente por diversos ramos como indústrias químicas, farmacêutica, alimentícia e outras (SILVA et al., 2004; SPOLAORE et al., 2006).

As microalgas também são exploradas pela indústria de energia para a produção de biodiesel e outras fontes de energia limpa (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Contudo, mesmo com tantas aplicações, o seu potencial ainda não foi totalmente explorado (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012).

Na aquicultura, as microalgas representam uma importante fonte de carboidratos, proteína e lipídios, especialmente de ácidos graxos poli-insaturados (FERREIRA; SOUZA-SOARES; COSTA, 2013).

De acordo com o organismo cultivado, as microalgas podem ser o principal alimento em todo o ciclo produtivo, como no caso dos moluscos bivalves, ou nas fases iniciais de desenvolvimento, como no cultivo de camarões e peixes (SILVA et al., 2004).

Na malacocultura, dentre as várias espécies de microalgas existentes e utilizadas para a alimentação nos cultivos aquícolas, as mais utilizadas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Lista das espécies de microalgas mais utilizadas na malacocultura.

Espécie	Classe	Tamanho (µm)
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Takano 1968)	<i>Bacillariophyceae</i>	2,5 – 8,0
<i>Chaetoceros muelleri</i> (Lemmermann 1898)	<i>Bacillariophyceae</i>	4,0 – 9,0
<i>Skeltonema costatum</i> (Cleve 1873)	<i>Bacillariophyceae</i>	6,0 – 10,0
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (Hasle & Heimdal 1970)	<i>Bacillariophyceae</i>	2,5 – 10,0
<i>Isochrysis galbana</i> (Parke 1949)	<i>Prymnesiophuceae</i>	2,0 – 7,0
<i>Navlova lutheri</i> (Green 1975)	<i>Prymnesiophuceae</i>	
<i>Traselmis</i> sp.	<i>Prasinophyceae</i>	8,0 – 12,0
<i>Nannochloropsis oculata</i> (D.J.Hibberd 1981)	<i>Chlorophyceae</i>	1,0 – 3,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i> (Butcher 1959)	<i>Chlorophyceae</i>	6,5

Fonte: Adaptado de RICHMOND (2004) e SILVA et al. (2004).

Além destas espécies listadas, outras também são utilizadas na alimentação em sistemas de produção aquícolas, e várias também são as formas de cultivá-las, porém é importante conhecer como ocorre o desenvolvimento e quais fatores contribuem para o seu crescimento.

1.3. CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Para o crescimento das microalgas cultivadas na aquicultura, além da água que é o ambiente de vida destas, são necessários outros dois fatores principais, luz e nutrientes (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006; CRESWELL, 2010).

A fonte de luz é importante para o cultivo das microalgas, por serem organismos fotossintéticos, podendo ser cultivadas com iluminação artificial constante, desde que atendam às exigências da espécie além dos demais parâmetros como qualidade de água, temperatura e salinidade (Tabela 2) para o crescimento algal (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006; CRESWELL, 2010).

Tabela 2 – Faixa de temperatura, luminosidade e salinidade para a produção de microalgas.

Espécie	Temperatura (°C)	Luminosidade (lux)	Salinidade (‰)
<i>Chaetoceros muelleri</i>	25 – 30	8.000 – 10.000	20 – 35
<i>Skeletonema costatum</i>	10 – 27	2.500 – 5.000	15 – 30
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	5 – 33	5.000 – 10.000	6 – 53
<i>Isochrysis galbana</i>	25 – 30	2.500 – 10.000	10 – 30
<i>Pavlova viridis</i>	15 – 30	4.000 – 8.000	6 – 53
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20 – 30	2.500 – 8.000	0 - 36

Fonte: Adaptado de CRESWELL, 2010.

Outro fator que influencia no crescimento das microalgas é a alimentação que vem através do fornecimento de macro e micro nutrientes dissolvidos em água, marinha ou não, resultando no meio de cultivo (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Estes meios de cultivo possuem diversas formulações e dentre estes, para o uso em algas marinhas, destacam-se os meios Guillard F e F/2 (GUILLARD, 1975), Conway (WALNE, 1980) e Algal 1 (OLIVEIRA, 1998).

Estes são produzidos em diversos volumes, de acordo com o consumo no cultivo. Na Tabela 3 apresenta-se a formulação para 1 L de meio de cultura, utilizando água marinha filtrada e esterilizada (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Tabela 3 – Componentes e sua quantidade para produção de 1 L de meio de cultura Guillard F/2, Conway e Algal 1.

Componentes	Quantidade dos componentes (mg.L ⁻¹)		
	Guillard F/2	Conway	Algal1
NaNO ₃	75,00	100,00	170,00
NaH ₂ PO ₄	5,00	20,00	11,90
NaSiO ₃ .9H ₂ O*	15,00 – 30,00	40,00	61,09
Na ₂ EDTA	4,36	45,00	70,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15	1,30	-
FeSO ₄	-	-	4,90
H ₃ BO ₃	-	33,60	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01	0,02	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022	-	0,10
ZnCl ₂ .7H ₂ O	-	0,02	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,010	0,02	0,017
MnCl ₂ .6H ₂ O	0,18	0,36	0,125
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006	-	0,205
(NH ₄) ₂ MoO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	-	0,018	-
Vitamina B ₁₂ (Cianocobalina)	0,0005	0,005	-
Vitamina H (Biotina)	0,0005	-	0,005
Vitamina B ₁ (Tiamina)	0,10	0,10	0,035

* - só para uso em diatomáceas

Fonte: SILVA et al., 2004.

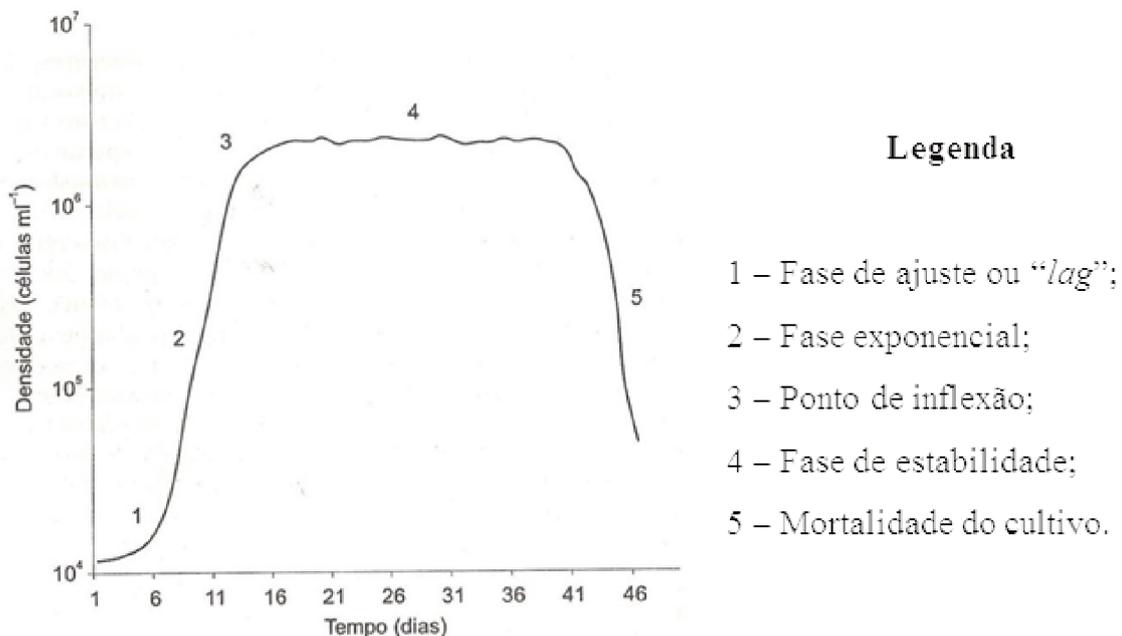
Com o meio de cultura correto e as condições adequadas as microalgas crescem e multiplicam-se em número de células, aumentando a sua população. Este crescimento é quantificado através de sua densidade celular (número de células algais por volume) ao longo do tempo, o qual apresenta uma curva característica de crescimento (Figura 1), que pode variar de acordo com a espécie e condições de cultivo (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

A partir da inoculação do cultivo, a primeira região da curva (1) é conhecida com fase de ajuste ou “lag”, seguida pela fase exponencial (2), onde a multiplicação celular é intensa, podendo dobrar a sua densidade celular em questão de horas.

Posteriormente a esse aumento, ocorre um ponto de inflexão (3) que, após terem consumido grande parte dos nutrientes disponíveis no sistema de cultivo, o crescimento das microalgas desacelera e iniciasse a fase de estabilidade do crescimento (4), onde por um determinado período ocorre morte celular, mas continua ocorrendo multiplicação celular, mantendo a população algal estável.

Por fim, após o consumo de praticamente todos os nutrientes, somado ao efeito acumulado da mortandade celular ocorrida anteriormente, o cultivo entra em colapso com a mortalidade massiva das microalgas (5) (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Figura 1 – Curva característica de crescimento de microalgas em sistema estático



Fonte: Lourenço, 2006.

De acordo com a espécie e o sistema de cultivo, pode apresentar outro comportamento e pode-se também aplicar os princípios básicos de culturas microbianas para o seu cultivo, mantendo-as em condições controladas, observando os fatores e condições que contribuem para o seu crescimento (RICHMOND, 2004).

1.4. CULTIVO DE MICROALGAS

As microalgas podem ser cultivadas de diversas formas, todas levando em conta as características das espécies a serem cultivadas, seu objetivo de uso e suas respectivas faixas ideais de parâmetros de cultivo, como luminosidade, temperatura, salinidade e demais parâmetros.

Uma das formas de cultivo é em ambiente aberto (expostos ao ar livre, com luminosidade natural), com lagos, *raceway*, tanques e piscinas, tendo influência direta de fatores externos (BOROWITZKA, 1999).

Nestes casos, podem ocorrer problemas devidos aos fatores climáticos, com chuvas intensas, forte insolação e a ocorrência de contaminação do cultivo por outros organismos, especialmente se o cultivo permanecer por um longo período aberto ao ambiente, podendo causar prejuízos a cultura ou até a perda total desta.

Outra forma de cultivar microalgas é em ambiente fechado, com maior controle de parâmetros de cultivo, sendo utilizados tanques, garrafas, tubos e bolsas plásticas (BOROWITZKA, 1999).

Por estarem em locais abrigados, o risco de contaminações vindas do meio externo é menor e há um controle maior da produção.

Além das formas já apresentadas, as microalgas podem ser cultivadas em fotobiorreatores, onde são cultivadas em estrutura fechada, foi desenvolvido para produzir uma grande densidade celular por volume e pode ser instalado em ambiente aberto (recebe luz ao ar livre) ou fechado (recebe luz artificial).

Seu principal diferencial em relação a outras estruturas de cultivo é a maior área de absorção de luminosidade, o que faz com que o crescimento algal seja maior e mais rápido, atingindo uma alta produção de biomassa em curto período (BOROWITZKA, 1999).

Além da grande variedade de formas de cultivos, podemos classificar os cultivos mediante o seu sistema de colheita, sendo dividido os cultivos em sistema estático ou de batelada (*batch*), sistema contínuo e sistema semicontínuo (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

1.4.1. Sistema estático ou de batelada (*bath*)

No sistema estático clássico, o cultivo se inicia com a inoculação das microalgas e adição dos nutrientes, não havendo nenhuma reposição de meio de cultura ou correção do volume devido a evaporação até o dia de colheita do volume total.

Neste sistema de cultivo, o crescimento algal apresenta curva semelhante com a curva característica de crescimento das microalgas, porém sendo o sistema colhido antes do início do colapso de sua produção (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Este sistema é muito empregado nos cepários, onde são preparados os inóculos dos sistemas de maior produção, onde em pequenos volumes e muitas vezes sem aeração ou injeção de CO₂, as culturas ficam por alguns dias, de acordo com a espécie, até atingirem o crescimento desejado.

Há também uma variação deste sistema que é o cultivo estático alimentado, que inicia de forma análoga, porém a cada intervalo de tempo recebe uma nova carga de nutrientes, podendo fazer com que o cultivo aumente a sua densidade celular. Desta forma, entra-se novamente na fase exponencial ou prolonga-se a fase estacionária.

1.4.2. Sistema contínuo

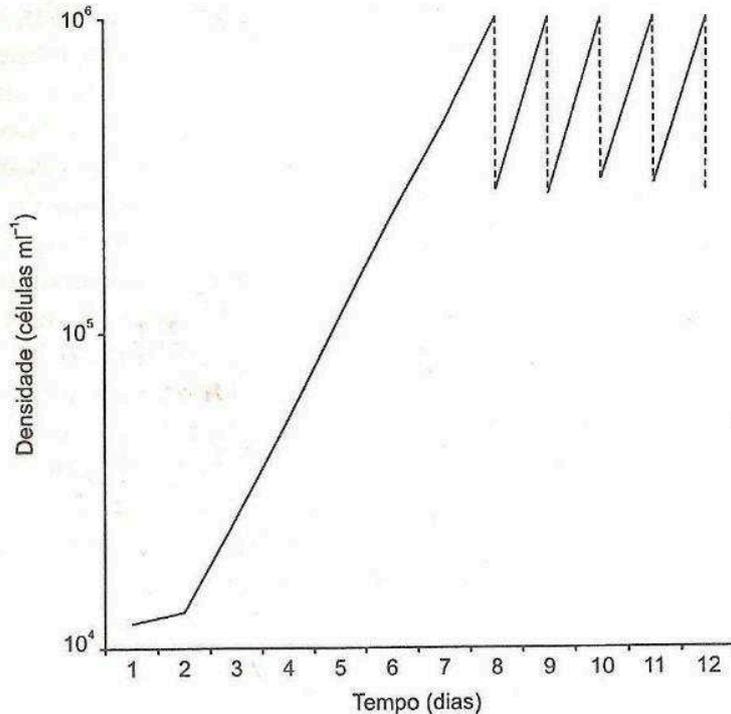
No sistema contínuo, por sua vez, ocorrem colheitas de pequenos volumes de forma constante, sendo o mesmo volume colhido repostado com água e nutriente, apresentando uma maior complexidade para controle destes volumes de colheita e reabastecimento do sistema, além de outros apetrechos para manter sua conformidade (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

1.4.3. Sistema semicontínuo

No sistema semicontínuo, após a microalga ter atingido o seu ponto de crescimento máximo ou respeitando o período de cultivo, ocorrem diversas colheitas parciais durante a produção em volumes e momentos específicos (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Após a colheita, o cultivo é reabastecido com água e meio de cultura no mesmo volume colhido, assim a densidade celular é reduzida, iniciando-se um novo crescimento até o ponto máximo, onde ocorrerá uma nova colheita (Figura 2). Este ciclo se repete enquanto a qualidade das microalgas se mantiver adequada (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Figura 2 – Curva característica de crescimento de microalgas em sistema semicontínuo.



Fonte: Lourenço, 2006.

Contudo, cada forma e sistema de cultivo se adapta ao volume de produção desejado e condições disponíveis para estes, além de levar em consideração o destino das microalgas cultivadas.

Quando as microalgas são cultivadas para alimentar outros organismos, estas devem suprir as necessidades nutricionais e para isso é importante o conhecimento da composição química destas.

1.5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS

Cada espécie de microalga possui uma determinada composição química, onde variam seus percentuais de carboidrato, lipídio, proteína, fibras, pigmentos e outros compostos.

Na Tabela 4 há uma descrição da composição química de algumas microalgas utilizadas para alimentação na aquicultura (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Tabela 4 – Composição química de algumas microalgas utilizadas na aquicultura, percentuais médios de carboidratos (C%), lipídeos (L%) e proteínas (P%).

Espécie	C%	L%	P%	Referências
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	6,0	16,0	34,0	Brown (1991)
<i>Skeletonema costatum</i>	12,0	13,5	27,9	Renaud, et al. (1999)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	8,8	19,0	34,0	Brown (1991)
<i>Isochrysis galbana</i>	12,9	23,0	29,0	Brown (1991)
<i>Pavlova lutheri</i>	9,0	12,0	29,0	Brown (1991)
<i>Tetraselmis</i> sp.	8,0	12,6	29,9	Renaud, et al. (1999)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	7,8	18,0	35,0	Brown (1991)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	12,2	15,0	20,0	Brown (1991)

Fonte: LOURENÇO (2006).

Devido a estas características de composição química de cada espécie de microalga, em geral na aquicultura, mais de uma espécie é utilizada na dieta alimentar de organismos aquáticos de forma direta, no caso da malacocultura, ou indiretamente, como no enriquecimento nutricional de outro organismo que servirá de alimento, como no uso de rotíferos e artêmia salina (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006; PONIS et al., 2008).

Alguns fatores, como o estágio de crescimento, meio de cultura e o sistema de cultivo podem produzir efeitos sobre a composição química da microalga cultivada (BROWN et al., 1993; ZHU; LEE; CHAO, 1997; LIN et al., 2007; BENVENUTI et al., 2016; CANCELA et al., 2016).

Atualmente, com os avanços tecnológicos é possível induzir o acúmulo de lipídios, chegando a 70% da composição celular, onde estas microalgas cultivadas tem o foco principal a produção de biodiesel e extração de ácidos graxos de cadeia longa (LC-PUFA) para alimentação humana e animal (PATIL et al., 2006; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

1.6. *Isochrysis* aff. *galbana* e *Pavlova lutheri*

Dentre as microalgas pertencentes a classe *Prymnesiophyceae*, estão a *Isochrysis* aff. *galbana* e *Pavlova lutheri*, foco deste estudo, ambas são dotadas de dois flagelos, apresentam locomoção na coluna d'água e coloração marrom-dourada (SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Estas espécies possuem amplo uso na aquicultura devido aos seus altos teores de proteína e de ácidos graxos poli-insaturados como ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), importantes para o desenvolvimento das larvas de moluscos

bivalves. (LOMBARDI; WANGERSKY, 1995; ZHU; LEE; CHAO, 1997; DERNER et al., 2006; RICO-VILLA et al., 2006; PONIS et al., 2008).

Devido a sua importância para os cultivos aquícolas, especialmente na malacocultura, estas espécies tiveram suas composições químicas descritas em 1989 por Fernández-reiriz et al. com outras 5 espécies de microalgas também utilizadas na malacocultura.

Neste mesmo ano, Volkman et al. (1989) apresentaram um estudo focado nos ácidos graxos e lipídeos destas espécies, além de outras 8 espécies com aplicação na maricultura.

Também no ano de 1989, Emdadi e Berland (1989) apresentaram um estudo da variação do conteúdo lipídico das microalgas *Pavlova lutheri* e *Nannochloropsis salina* durante o crescimento destas em sistema estático.

Com o foco na qualidade dos lipídeos produzidos pela *I. galbana* Sukenik e Wahnou (1991) conduziram um estudo que avaliou a produção destes lipídeos quando a microalga era exposta a diferentes condições luminosas e limitação nutricionais de nitrogênio.

Todos os estudos citados até então utilizaram o sistema estático de cultivo, com a interação de alguns fatores de cultivo como temperatura, fotoperíodo entre outros.

Um dos primeiros trabalhos relacionando o sistema semicontínuo e a composição química das microalgas foi apresentado por Brown et al. (1993), com as microalgas *I. galbana*, *P. lutheri* e *N. oculata*, utilizando uma taxa de colheita de 15% do volume a cada 2 dias de cultivos, iniciando após o término da fase exponencial de crescimento.

Em 1995, Renaud et al. estudaram os efeitos de diferentes temperaturas de cultivo no crescimento algal, percentual de lipídios totais e sua composição lipídica com as microalgas *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *N. paleacea* (formerly *frustulum*), e Tahitian *Isochrysis* sp. (T.ISO) em sistema estático de cultivo.

No mesmo ano Tatsuzawa e Takizawa (1995) divulgaram um estudo com a mesma linha de pesquisa, porém com a microalga *P. lutheri*.

Em 1997, Otero, García e Fábregas apresentaram um estudo usando o sistema semicontínuo onde avaliaram diferentes taxas de colheita sobre a o percentual de EPA nos lipídeos totais das microalgas *Phaeodactylum tricornerum*, *I. galbana* e *Porphyridium cruentum*.

Um estudo foi realizado por Fidalgo et al. (1998) onde se avaliou diferentes fontes de nitrogênio na composição química da microalga *I. galbana* cultivada em sistema estático em diferentes fases de crescimento.

Outro estudo utilizando a microalga *I. galbana* foi realizado por Sánchez, Martínez e Espinola, no ano de 2000 avaliando o percentual de proteínas totais e a caracterização dos

ácidos graxos da microalga quando cultivada em sistema estático em fotobioreator (FBR) ao utilizar 5 meios de cultura diferentes.

Neste mesmo ano, A Carvalho e Malcata (2000) também utilizaram 4 meios de cultura diferentes para avaliar o efeito sobre os ácidos graxos da microalga *P. lutheri* cultivada em sistema estático.

O estudo conduzido por Pernet et al. (2003) apresentaram a caracterização de ácidos graxos e lipídeos das microalgas *I. galbana* e *C. muelleri* cultivadas em sistema semicontínuo.

Em 2008, Ponis et al. apresentaram os resultados de um experimento com *P. lutheri* cultivada em regime semicontínuo para alimentação de larvas do molusco *C. gigas*, avaliando a manutenção de sua biomassa em baixas temperaturas para oferta posterior aos moluscos.

Em 2009, Guihéneuf et al. realizaram um estudo onde a microalga *P. lutheri* foi submetida a um cultivo estático onde variou-se a intensidade luminosa em irradiância PAR e diferentes fontes de carbono no meio de cultura visando avaliar o crescimento e lipídios e o perfil de ácido graxos desta cultivos.

Contudo, a grande maioria destes estudos utilizaram o sistema estático até que a microalga cultivada atingisse o ponto de estabilidade em sua curva de crescimento para então, a partir deste momento, iniciar o tratamento semicontínuo, o que, em uma produção massiva pode gerar problemas no fornecimento de alimento para os moluscos bivalves, pois de acordo com a espécie este fase inicia-se somente após o 12º dia de cultivo.

1.7. HIPÓTESE

Num sistema semicontínuo de produção de microalgas, ao variar a taxa de colheita, pode ocorrer reflexo em sua densidade celular ao longo do cultivo, na produção de biomassa seca destas microalgas e em suas composições químicas, de acordo com a espécie cultivada.

1.8. OBJETIVO

Avaliar o efeito da colheita na produtividade e na qualidade nutricional das microalgas *Isochrysis* aff. *galbana* e *Pavlova lutheri* produzidas em sistema semicontínuo com diferentes percentuais de colheita.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITO DO PERCENTUAL DE COLHEITA DAS MICROALGAS *Isochrysis aff. galbana* E *Pavlova lutheri* PRODUZIDAS EM SISTEMA SEMICONTÍNUO

George Martins da Cunha¹, Simone Sühnel¹, Jaqueline Araújo¹, César Damian², Giseli Olivo², Francisco José Lagreze-Squella³, Gilberto J. P. Onofre de Andrade¹, Claudio Manoel Rodrigues de Melo¹.

¹ - Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Serv. dos Coroas, 503 – Barra da Lagoa. Florianópolis/SC. 88061-600.

² - Laboratório de Físico-química (LABCAL/UFSC). Rod. Admar Gonzaga, 1346 – Itacorubi. Florianópolis/SC. 88034-001.

³ - Centro de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Rio Grande do Norte, s/nº – Mirassol. Pontal do Paraná/PR. 83255-000.

Resumo

Microalgas flageladas como *Isochrysis galbana* (ISO) e *Pavlova lutheri* (PAV) são umas das espécies produzidas nos *hatcheries* para alimentação de moluscos bivalves. Neste estudo foi avaliado os efeitos de diferentes percentuais de colheita (30, 50 e 70%), em sistema semicontínuo, sobre a produtividade e a composição química destas microalgas em comparação ao sistema de cultivo estático alimentado. Foram utilizadas 15 garrafas de vidro (10.000 mL), onde iniciou-se com 225 mL (2,5%) de inoculo (Guillard f/2) em 8.775 mL de água salgada contendo meio Conway (1 mL.L⁻¹). A colheita no sistema semicontínuo foi realizada a cada 4 dias. Após a colheita, o volume coletado foi repostado com água salgada e meio Conway. Ao sistema estático alimentado foi adicionado meio Conway (1 mL.L⁻¹) a cada 4 dias e as colheitas foram realizadas no 12º e 24º dia de cultivo. Utilizou-se água a 24±1°C e foto período de 24 h. A contagem celular foi realizada diariamente e o experimento teve duração de 24 dias. Observaram-se diferenças (p<0,05) na densidade celular entre os tratamentos do semicontínuo a partir do 4º dia. A microalga *I. galbana* entrou em sua fase de estabilidade de crescimento a partir do 9º dia, o que não ocorreu com a *P. lutheri* que apresentou valores crescente ao longo do cultivo. A maior densidade celular para a microalga ISO nos tratamentos do semicontínuo ocorreu no 8º dia, alcançando 1.411,46±99,82, 1.344,79±71,69 e 1.144,79±51,76 x10⁴ células.mL⁻¹ para os percentuais de colheita 30, 50 e 70% respectivamente. Para PAV a maior densidade celular ocorreu no 24º dia de cultivo para todos os tratamentos com 1.776,04±102,76, 1.581,25±76,03 e

$1.242,71 \pm 109,39 \times 10^4$ células.mL⁻¹ para os percentuais de colheita 30, 50 e 70%, respectivamente. A produção de biomassa seca do sistema semicontínuo não apresentou diferenças ($p < 0,05$) em relação ao sistema estático alimentado no 12º dia de cultivo (T12) para a ISO. Já em T24 para ISO e no cultivo da PAV os tratamentos do sistema estático alimentado apresentaram valores maiores de produção. Os tratamentos não apresentaram diferenças na composição química das microalgas ao longo dos cultivos.

Palavras-chave: *Isochrysis aff. galbana*, *Pavlova lutheri*, produção de microalgas, peso seco, análise bromatológica.

2.1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a aquicultura representa parte importante na produção de alimentos (FAO, 2016), onde no ano de 2014 o estado de Santa Catarina se destacou como principal produtor de bivalves marinhos (ostras, vieiras e mexilhões) e tendo a capital do estado, Florianópolis, como maior fornecedora de sementes de ostras para os maricultores brasileiros (IBGE, 2016).

Para produção destas sementes de ostras e vieiras em laboratório faz-se necessário a manutenção de reprodutores, larvas e sementes, onde são alimentados com microalgas, sua principal fonte de alimento (SILVA et al., 2004).

As microalgas que são cultivadas nestes laboratórios para servirem de alimento para os reprodutores, larvas e sementes destes moluscos são, de forma geral, organismos fotossintéticos que tem a água como seu habitat (DERNER et al., 2006; LOURENÇO, 2006), variando em forma, tamanho, estrutura celular e composição química (BRENANN & OWENDE, 2010; MAITY et al., 2014).

Além de serem importante fonte de alimento para a aquicultura, (FERREIRA; SOUZA-SOARES; COSTA, 2013) as microalgas são exploradas por indústrias químicas, farmacêuticas, alimentícias (SILVA et al., 2004; SPOLAORE et al., 2006) e mais recentemente pela indústria da energia limpa como fonte de fabricação de biodiesel (FERREIRA; SOUZA-SOARES; COSTA, 2013) e mesmo estes organismos sendo tão versáteis e estudados por anos, ainda não foi explorado todo o seu potencial (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012).

Para o cultivo destas microalgas, além de atender as exigências das espécies, como luminosidade, temperatura e nutrição adequada (RICHMOND, 2004; SILVA et al., 2004; LOURENÇO, 2006; CRESWELL, 2010), temos que optar pela forma de cultivo, utilizando

sistemas abertos como tanques, lagos e *raceways*, ou sistemas fechados em bolsas plásticas, tubos e fotobioreatores (BOROWITZKA, 1999).

Outro critério é o sistema de cultivo de acordo com a colheita, escolhendo o que melhor atende à demanda entre o sistema estático, contínuo ou semicontínuo (LOURENÇO, 2006; SILVA et al., 2004).

Dentre as microalgas pertencentes a classe *Prymnesiophyceae*, estão a *Isochrysis* aff. *galbana* e *Pavlova lutheri*, foco deste estudo, ambas possuem amplo uso na aquicultura devido aos seus altos teores de proteína e de ácidos graxos poli-insaturados como ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), importantes para o desenvolvimento das larvas de moluscos bivalves. (LOMBARDI; WANGERSKY, 1995; ZHU; LEE; CHAO, 1997; DERNER et al., 2006; RICO-VILLA et al., 2006; PONIS et al., 2008).

Em 1993 Brown et al. apresentaram um estudo envolvendo as microalgas *I. galbana*, *P. lutheri* e *N. oculata*, em sistema estático e semicontínuo, descrevendo as composições químicas encontradas nestes cultivos, posteriormente Otero, García e Fábregas (1997) com as microalgas *Phaeodactylum tricornutum*, *I. galbana* e *Porphyridium cruentum* com o foco na produção de EPA.

Na década passada, Pernet et al. (2003) apresentaram a caracterização de ácidos graxos e lipídeos das microalgas *I. galbana* e *C. muelleri* cultivadas em sistema semicontínuo e Ponis et al. (2008) apresentaram os resultados de um experimento com *P. lutheri* cultivada em regime semicontínuo para alimentação de larvas do molusco *C. gigas*, avaliando a manutenção de sua biomassa em baixas temperaturas para se ofertar posteriormente aos moluscos.

Neste contexto o presente estudo teve como objetivo comparar o efeito de diferentes percentuais de colheita do cultivo de microalgas em sistemas semicontínuo, iniciando a sua colheita a partir do 4º dia de cultivo, ou seja, não aguardando a cultura atingir a fase estacionária de crescimento e sistema estático alimentado cultivo sobre sua produção de biomassa seca e composição química.

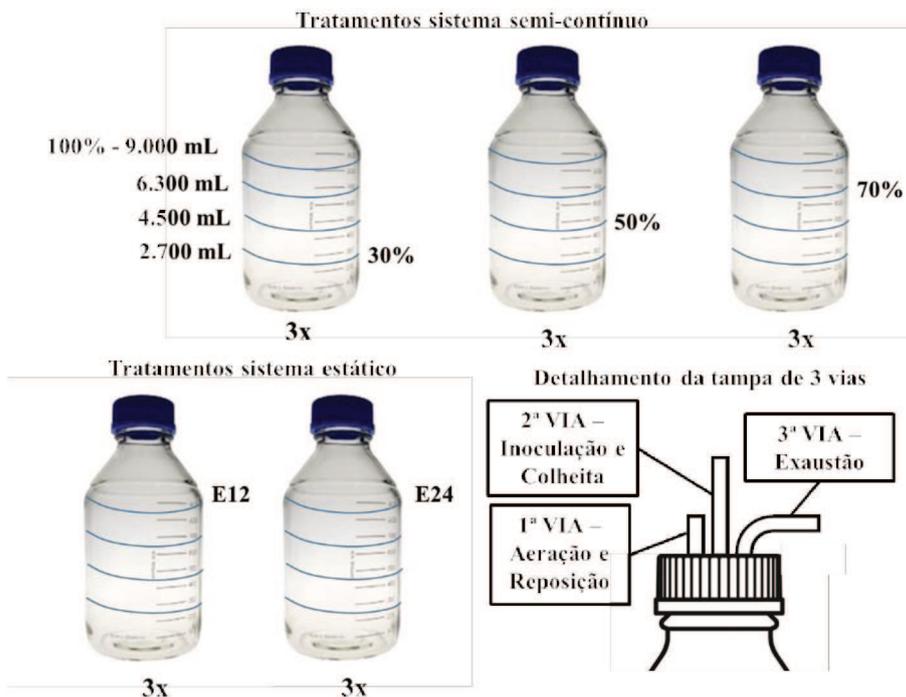
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos de cultivo de microalgas falgeladas em sistema semicontínuo; um com a microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO; CCMP 1324) e outro com *Pavlova lutheri* (PAV; CCMP 1325). Em ambos experimentos foram avaliadas

três proporções de colheita, sendo elas 30%, 50% e 70% do volume total. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM/UFSC) em garrafas de borosilicato [10.000 mL; unidade experimental (UE)], com volume de útil de 9.000 mL (Figura 1), mantidas em ambiente controlado sob iluminação (2 lâmpadas fluorescente tubular T10, 40W OSRAM com irradiância PAR de $240 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ contaste (24 h)) e aeração filtrada ($0,2 \mu\text{m}$), temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ com adição de CO_2 ($0,25 \text{ L.min}^{-1}$). Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente ao acaso com três tratamentos (percentuais de colheitas) e três repetições.

Em cada experimento, além das 9 garrafas utilizadas para avaliar a porcentagem de colheita em sistema semicontínuo, foram inoculadas outras 6 garrafas e mantidas em sistema estático de cultivo alimentado (sistema estático alimentado com nutrientes a cada 6 dias de cultivo; como controle), sendo três garrafas colhidas com 12 dias (tratamento controle E12) e outras três com 24 dias (tratamento controle E24). O tratamento E12 foi utilizado para análise bromatológica e o peso seco das microalgas após 12 dias de cultivo (T12). Já o tratamento E24, a análise bromatológica e o peso seco foram avaliados após 24 dias de cultivo (T24). A densidade celular de E12 foi avaliada até o T12 e a do E24 até T24.

Figura 1 – Exemplo das UE utilizadas para o cultivo, em sistema semicontínuo, estático, e detalhamento da tampa de 3 vias.



O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente, através de contagem celular em microscópio ótico com o uso de câmara de *Neubauer* em duplicata e registrado o pH e temperatura através de medidor de bancada (ALFAKIT AT350) e salinidade por refratômetro manual (modelo 211 BIOBRIX). A colheita em cada tratamento foi realizada a cada 4 dias com posterior reposição do volume colhido com água salgada (filtrada a 0,2 µm e esterilizada com UV) de meio de cultura Conway (Walne, 1966) na proporção de 1 mL.L⁻¹. Para as garrafas mantidas em sistema estático alimentado, a cada 6 dias de cultivo foi adicionado o mesmo meio de cultura.

Antes da retirada da amostra e colheita o cultivo foi homogeneizado por meio de agitação manual de cada UEs.

Para avaliar o efeito da porcentagem de colheita no valor nutricional das microalgas, no início do experimento (T0), após 12 dias de cultivo (T12) e após 24 dias (T24), quando encerrou o experimento, foi armazenada cultura para análise bromatológica através de centrifugação e posterior liofilização da biomassa produzida. Além disso, nestes tempos (T0, T12 e T24) uma amostra de cultura de cada UE foi utilizada para avaliação da presença/ausência de *Vibrio* sp.

Para ambos experimentos, as cepas, de *I. aff. galbana* e *P. lutheri*, foram cultivadas em sistema estático com meio Guillard f/2.

Antes de iniciar o experimento, cada UE foi preenchida com 8.775 mL de água salgada (filtrada a 0,2 µm e esterilizada com UV), fechada com tampa de 3 vias (1ª via para aeração/reposição, 2ª exaustão e a 3ª inoculação/colheita, ver Figura 1), adicionado meio de cultura Conway) no volume de 9 mL (1 mL.L⁻¹) e esterilizada (UE) em autoclave (120 °C por 20 min). Após esterilização, foi inoculado 225 mL da microalga com o auxílio de uma mangueira de transferência previamente autoclavada (120 °C por 20 min), conectando a 3ª via da tampa e obstruindo a 2ª via da garrafa do inóculo (via de exaustão), aumentando a pressão interna e forçando a saída da cultura da garrafa do inóculo para a UE, entrando através da 3ª via, criando uma pressão positiva na garrafa. Após a inoculação iniciou o experimento.

As amostragens em cada UE para contagem celular e colheitas de água foram realizadas através da 3ª via da tampa e para reposição de água salgada e meio de cultura através da 1ª via, a fim de evitar contaminação por material residual.

A reposição de água salgada (filtrada a 0,2 μm e esterilizada com UV) foi realizada utilizando garrafas de borosilicato (10.000 mL) com tampas de 3 vias e mangueiras de silicone autoclavadas (120 °C por 20 min) de forma análoga ao processo de inoculação, porém repondo pela 1ª via da tampa da UE. A reposição de meio de cultura (1 mL.L⁻¹) foi realizada com o auxílio de uma seringa (100 mL) esterilizada em álcool 70%. Estas reposições foram feitas nos tempos T4, T8, T12, T16, T20, após os procedimentos de colheita dos tratamentos do semicontínuo.

2.2.1. Quantificação da presença/ausência de *Vibrio* sp.

Para avaliação da presença/ausência de *Vibrio* sp. nas culturas de cada UE foram utilizadas placas de petri (140 mm de diâmetro) contendo meio ágar TCBS (Difco) e inoculado 1 mL da cultura da cada UE. Após inoculação, as placas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada em 26°C por um período de 48 h. A leitura das placas foi realizada após 24 e 48 h de incubação.

2.2.2. Obtenção de biomassa liofilizada

Para avaliação bromatológica uma amostra de 2.000 mL de cada UE, colhidas nos tempos T12 e T24, foi inicialmente centrifugada (10 min à 3.500 rpm), descartado o sobrenadante, lavado com 40 mL de formiato de amônio (0,5 M). Esse processo de centrifugação e lavagem repetiu-se mais duas vezes. Na terceira centrifugação, após o descarte do sobrenadante, toda a biomassa foi acondicionada em tubos falcon (50 mL), fechados e armazenadas em freezer (-18 °C) para posterior liofilização.

Para liofilização, os tubos falcon contendo as amostras foram abertos e acondicionados no interior da liofilizadora, após isso iniciou-se o processo com duração de 48 h. Após este período, os tubos foram novamente fechados e vedados com filme plástico para evitar a entrada de umidade no interior destes e novamente acondicionados em freezer (-18 °C) para posterior análise bromatológica.

Após a obtenção do valor da biomassa seca, através da Equação 1 obtivemos as produtividades (P_r) microalgal de cada tratamento em mg.L⁻¹ e através da Equação 2 calculou-se o peso celular microalgal.

$$P_r = P_s / V_c$$

Onde:

P_r – Produção em biomassa seca (mg.L^{-1})

P_s – Peso seco (g)

V_c – Volume de cultura centrifugada (L)

$$P_c = (P_r/1000)/(d_c \times 10.000)$$

Onde:

P_c – Peso celular microalgal (pg)

P_r – Produção em biomassa seca (mg.L^{-1})

d_c – Densidade celular ($\times 10^4$ células. mL^{-1})

2.2.3. Análise bromatológica

Na avaliação bromatológica foi quantificada a proteína total, o carboidrato total e o lipídeo total em amostras liofilizadas de cada UE para todos os tratamentos, incluindo as garrafas mantidas em sistema estático.

As análises foram realizadas com amostras colhidas em T12 e T24 e ocorreram em duplicata a partir destas amostras de cada UE.

A proteína total foi determinada através do método colorimétrico, onde foram submetidas à hidrólise com 2 mL de NaOH 1N, exposição a ultrassom e centrifugação de 5 mg de amostra para obtenção do extrato alcalino. A partir deste extrato, seguiu-se a metodologia conforme descrito por Lowry et al. (1951), onde foram adicionados os reagentes para reação de cor.

O carboidrato total foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Dubois et al. (1956), na qual amostras de 5 mg foram submetidas à hidrólise com 1 mL de H_2SO_4 a 80% por 20 h, centrifugadas, diluídas e adicionado os reagentes para reação de cor.

Para a determinação do lipídeo total foi utilizado o método gravimétrico descrito por Folch et al. (1957), adicionando a 25 mg da biomassa liofilizada 3 mL de solução 1:2 de clorofórmio:metanol e centrifugadas para obtenção do extrato lipídico. Este extrato foi recuperado e transferido para outro tubo de ensaio onde adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 2 mL de água destilada, centrifugado e transferido para cadinho para secagem e posterior medição gravimétrica.

2.2.4. Análise estatística

Para avaliação da densidade celular entre as porcentagens testadas, o tratamento E24 foi utilizado como controle, por apresentar dados de densidade celular ao longo de todo o período experimental.

Os dados de densidade celular (células.mL⁻¹) das microalgas foram submetidos a análise de variância (p<0,05). Foi verificada a normalidade e a homocedasticidade dos erros. Os dados de produtividade (mg.L⁻¹) e o peso seco por célula (pg) foram analisados por teste t com permutação (Westfall et al., 1999). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Densidade celular

Os tratamentos do sistema estático E12 e E24 não apresentaram diferenças (p<0,05) de densidade celular (d_c) entre si durante o período de T1 a T12 nos experimentos com as microalgas *I. aff. galbana* e *P. lutheri*.

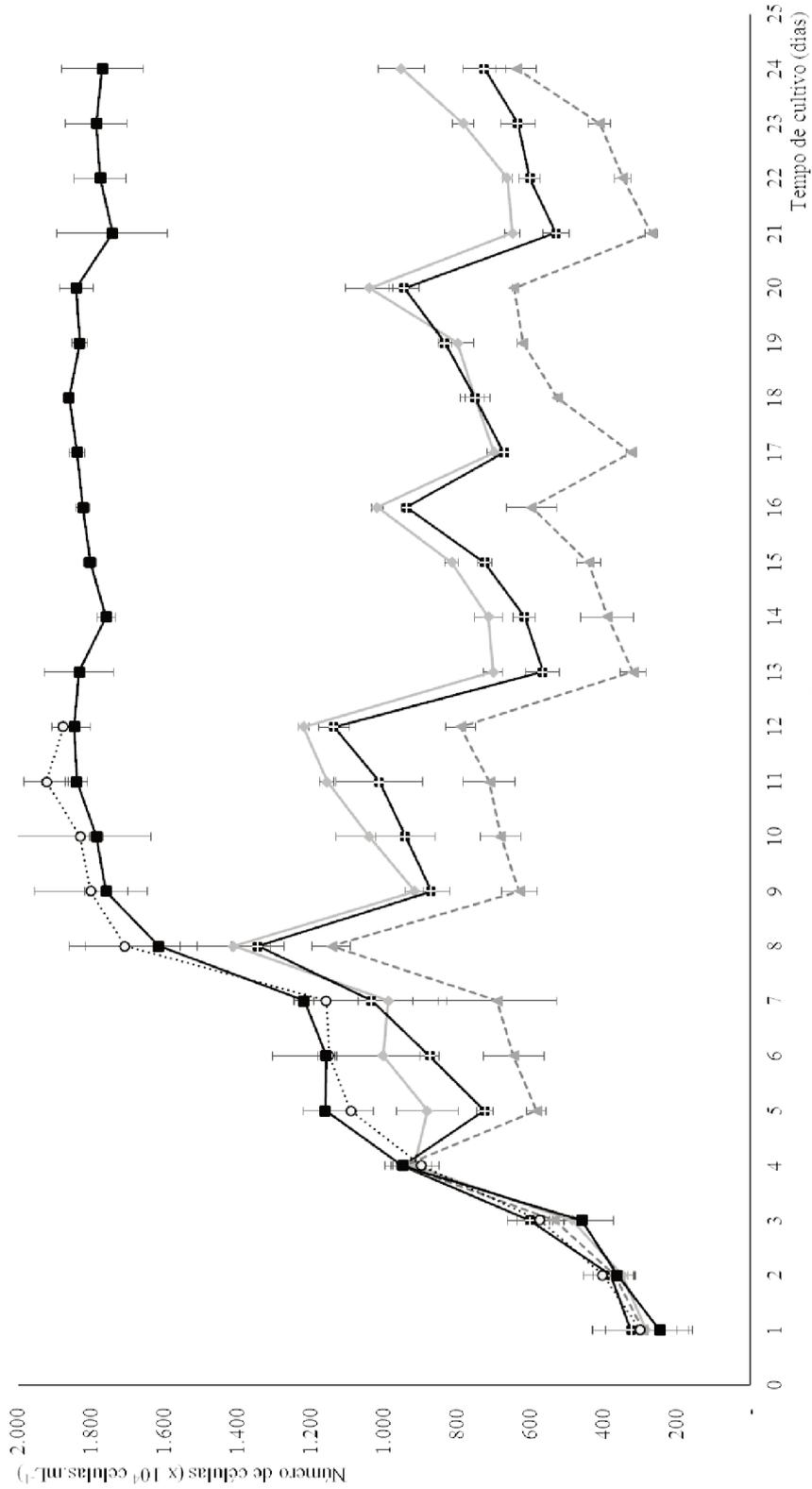
No experimento com a microalga *I. aff. galbana*, até o 4º dia de cultivo nenhum dos tratamentos apresentaram diferenças (p<0,05) em suas densidades celulares. No 5º dia de cultivo a densidade celular do tratamento sistema estático alimentado (E24; Figura 2) foi maior (1.161,46±60,62 x10⁴ células.mL⁻¹) (p<0,05) em relação aos tratamentos com sistema semicontínuo (30%, 50% e 70%). No 6º dia o tratamento E24 foi maior (1.158,33±24,27 x10⁴ células.mL⁻¹) (p<0,05) que a colheita de 50% e 70% e nos dias 7 e 8 apresentou densidade celular, 1.158,33±24,27, 1.219,79±26,58 x10⁴ células.mL⁻¹, respectivamente, maior (p<0,05) em relação ao tratamento 70%. A partir do 9º dia de cultivo, até o final (24º dia) o tratamento E24 foi maior (p<0,05) que os demais tratamentos, apresentados valores de densidade celular entre 1.742,71±150,66 - 1.860,42±12,63 x10⁴ células.mL⁻¹.

No sistema semicontínuo, a densidade celular (Figura 2) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (30%, 50% e 70%) até o 4º dia de cultivo. No dia subsequente, 5º dia, a densidade celular do tratamento 30% foi maior (882,29±83,23 x10⁴ células.mL⁻¹) (p<0,05) que 50% e 70%. Neste dia, os tratamentos 50% e 70% não apresentaram diferenças entre si. No 6º dia, o tratamento 70% foi menor (p<0,05) (646,88±82,15 x10⁴ células.mL⁻¹) que 30% e 50%. No 7º dia, o mesmo tratamento foi menor (691,67±162,39 x10⁴ células.mL⁻¹)

($p < 0,05$) ao 50% apenas. No 8º dia, ocorreu a segunda colheita dos tratamentos do sistema semicontínuo, onde nenhum destes apresentaram diferenças significativas em suas densidades celulares. Já do 9º ao 23º dia, o tratamento 70% apresentou menor densidade celular ($p < 0,05$) que os demais tratamentos e no período do 9º ao 14º e do 16º ao 23º dia os tratamentos 30% e 50% apresentaram densidade celulares sem diferença significativa. O tratamento 30% no 15º e no 24º dia foi maior ($p < 0,05$), $815,63 \pm 18,75 \times 10^4$, $953,13 \pm 63,43 \times 10^4$ células.mL⁻¹, respectivamente em relação aos demais tratamentos do semicontínuo. No último dia (24) os tratamentos 50% e 70% não apresentaram diferenças em suas densidades celulares.

Durante o experimento de cultivo com a microalga *I. aff. galbana* o pH apresentou pequenas variação, não apresentando diferenças significativa, ficando em $8,32 \pm 0,70$ em todos os tratamentos. O mesmo se verificou quanto a salinidade, apresentado um média de $34,0 \pm 1,2$ para todos os tratamentos.

Figura 2 – Densidade celular média (\pm SD) da microalga *Isochrysis* aff. *galbana* nos dias de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado.



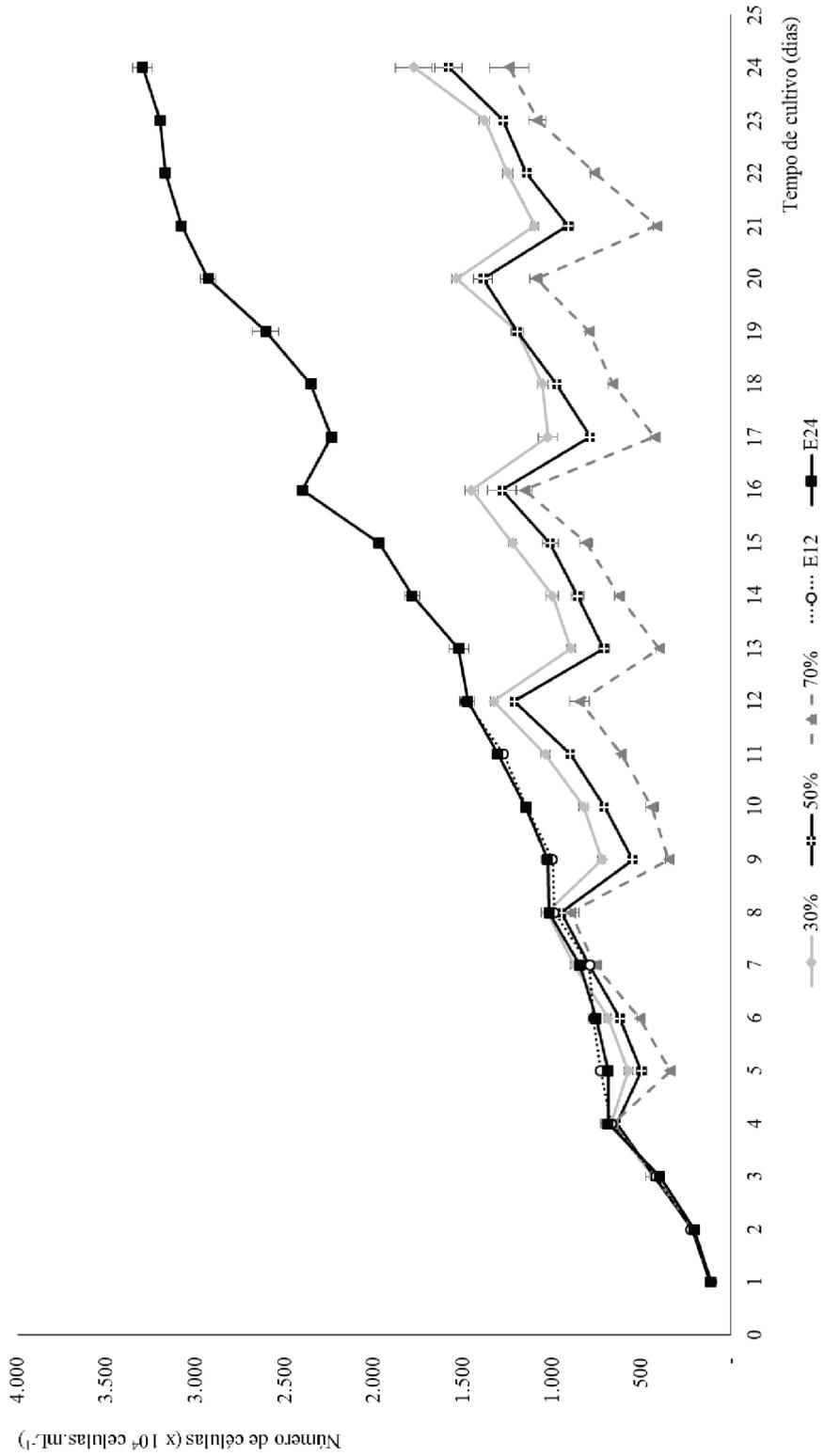
No experimento com *P. lutheri*, todos os tratamentos não apresentaram diferenças significativas em sua densidade celular (d_c) (Figura 3) até o 4º dia de cultivo.

O tratamento estático alimentado, E24, apresentou no 5º dia a maior densidade celular ($p < 0,05$) ($690,63 \pm 27,24 \times 10^4$ células.mL⁻¹) em relação aos demais tratamentos do semicontínuo (30%, 50% e 70%). No dia subsequente, 6º dia, a densidade celular no tratamento E24 foi maior ($758,33 \pm 14,09 \times 10^4$ células.mL⁻¹), diferente ($p < 0,05$) dos tratamentos 50% e 70% do semicontínuo. Nos dias 7 e 8, o tratamento E24 ($846,88 \pm 13,62$ e $1.019,79 \pm 25,45 \times 10^4$ células.mL⁻¹, respectivamente) apresentou densidade celular maior ($p < 0,05$) em relação ao tratamento 70% e sem diferença em relação aos tratamentos 30% e 50%. A partir do dia 9 até o final do cultivo, dia 24, o tratamento E24 apresentou valores crescentes de densidade celular, ($p < 0,05$) maiores em relação aos tratamentos do semicontínuo (30%, 50% e 70%).

Dentre os tratamentos do sistema semicontínuo, no 5º dia, a densidade celular de 30% foi ($p < 0,05$) maior ($576,04 \pm 23,03 \times 10^4$ células.mL⁻¹) que 50% e 70%, sendo estes não diferentes entre si. No 6º dia, o tratamento 70% apresentou densidade celular menor ($p < 0,05$) em relação a todos os demais tratamentos (30% e 50%). Neste mesmo dia os tratamentos 30% e 50% não apresentaram diferenças. Nos dias 7 e 8, os tratamentos do semicontínuo não apresentaram diferenças significativas entre si. A partir do 9º dia até o dia 22, o tratamento 70% apresentou a menor densidade celular, diferente ($p < 0,05$) dos tratamentos 30% e 50%. Neste período, os tratamentos 30% e 50% não apresentaram diferenças entre si, exceto no 15º dia, onde o tratamento 30% apresentou maior valor ($1.226,04 \pm 19,09 \times 10^4$ células.mL⁻¹) diferente ($p < 0,05$) dos tratamentos 50% e 70%. No dia 23 e 24, o tratamento 30% também apresentou maior ($p < 0,05$) densidade celular em relação a 50% e 70%, sendo no dia 23 a menor ($p < 0,05$) densidade celular observada para 70%. No último dia de cultivo (24), os tratamentos 50% e 70% não apresentaram diferenças entre si.

No cultivo com a microalga *P. lutheri* o pH apresentou não apresentando diferenças significativa, mantendo-se na média de $8,11 \pm 0,59$ em todos os tratamentos e a salinidade apresentou o mesmo comportamento, com média de $33,0 \pm 0,8$ para todos os tratamentos.

Figura 3 - Densidade celular média (\pm SD) da microalga *Pavlova lutheri* nos dias de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado.



2.3.2. Produção de biomassa seca

Na produção de biomassa seca da microalga *I. aff. galbana* colhida no 12º dia de cultivo (Figura 4), o tratamento 30% (semicontínuo), apresentou o maior valor entre os tratamentos ($333,97 \pm 38,74 \text{ mg.L}^{-1}$) ($p < 0,05$) e sem diferença ao tratamento E12 (estático). No mesmo dia (12) os tratamentos do semicontínuo, 50% e 70%, não apresentaram diferenças entre si e foram menores ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos 30% e E12. No último dia de cultivo (24º), a produtividade do tratamento E24 (estático) apresentou o maior valor ($499,95 \pm 79,96 \text{ mg.L}^{-1}$) ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos do semicontínuo (30%, 50% e 70%), estes por sua vez não apresentaram diferenças em sua produção.

A após a liofilização a maior produção da microalga *P. lutheri* em biomassa seca (P_r) (Figura 5) foi observada no tratamento E12 ($455,83 \pm 35,91 \text{ mg.L}^{-1}$) no dia 12 e no tratamento E24 no dia 24, ambos diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos do semicontínuo. Nestes dias, 12 e 24, os tratamentos 50% e 70% não apresentaram diferenças entre si.

Figura 4 – Produção de biomassa seca média (\pm SD) da microalga *Isochrysis aff. galbana* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado.

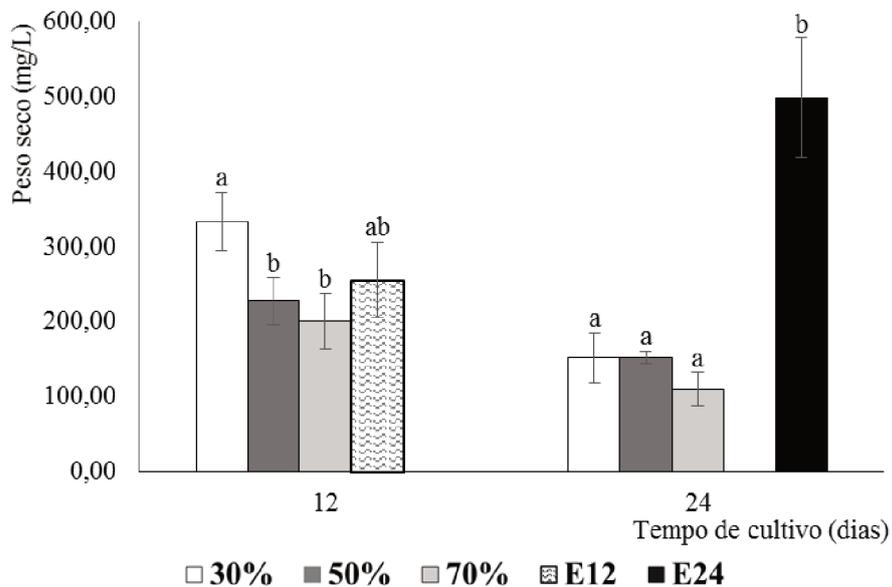
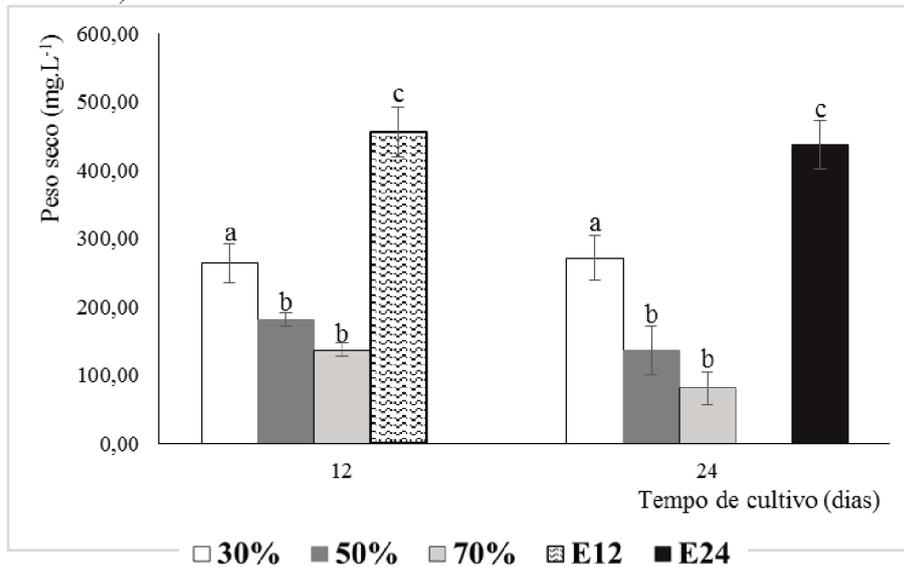


Figura 5 - Produção de biomassa seca média (\pm SD) da microalga *Pavlova lutheri* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado.



2.3.3. Peso seco celular

O peso seco da microalga *I. aff. galbana* por célula (Figura 6) da biomassa colhida no 12º dia para os tratamentos do sistema semicontínuo (30%, 50% e 70%) não apresentaram diferenças na microalga *I. aff. galbana* e o tratamento estático E12 apresentou o menor valor ($13,60 \pm 2,47$ pg.célula⁻¹) diferindo ($p < 0,05$) dos tratamentos 30% e 70%. No 24º, o peso seco por célula no tratamento estático E24 apresentou o maior valor ($28,26 \pm 4,41$ pg.célula⁻¹) ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos do semicontínuo 30% e 70%. Os tratamentos do semicontínuo não apresentaram diferenças entre si no peso seco por célula.

O maior valor de peso seco da microalga *P. lutheri* por célula (P_c) (Figura 7) apresentado no 12º dia foi do tratamento estático E12 ($30,69 \pm 2,27$ pg.célula⁻¹) diferindo significativamente ($p < 0,05$) do demais tratamentos. Entre os tratamentos do semicontínuo, o menor valor de P_c apresentado foi do tratamento 50% ($14,91 \pm 0,62$ pg.célula⁻¹) que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do tratamento 30%. No 24º dia, o tratamento semicontínuo 70% apresentou o menor ($p < 0,05$) P_c ($6,62 \pm 2,36$ pg.célula⁻¹) em relação aos outros tratamentos do mesmo dia de cultivo.

Figura 6 – Peso seco por célula médio (\pm SD) da microalga *Isochrysis* aff. *galbana* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado.

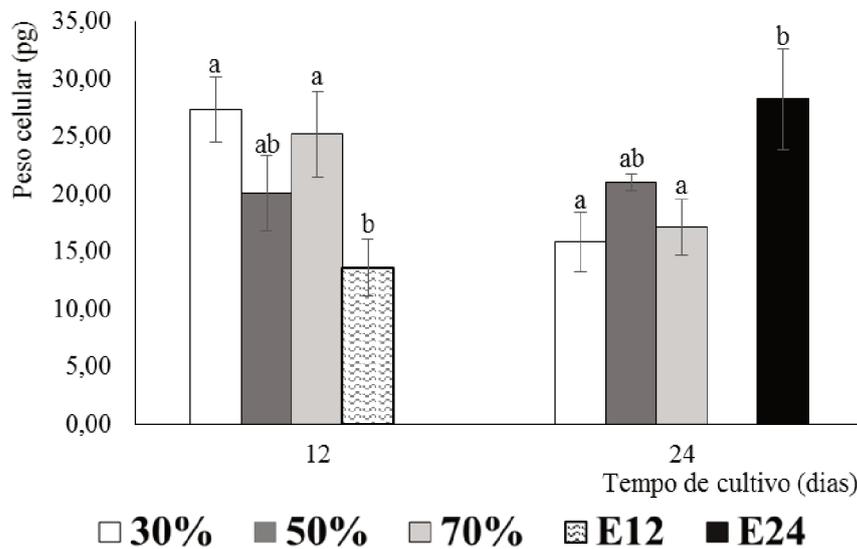
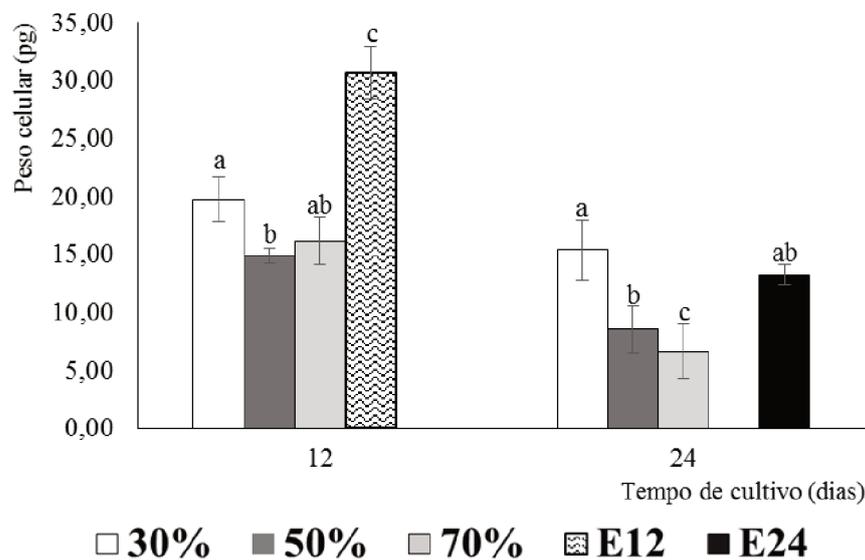


Figura 7 - Peso seco por célula médio (\pm SD) da microalga *Pavlova lutheri* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30%, 50% e 70%) e do estático alimentado.



2.3.4. Proteínas, lipídeos e carboidratos totais

A composição química (Tabela 1) das microalgas *I. aff. galbana* e *P. lutheri* não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) nos valores percentuais de proteínas totais, carboidratos totais e lipídeos totais entre os tratamentos no dia 12 e no dia 24 de cultivo.

Tabela 1 - Percentuais médios (%) (\pm SD) de proteínas totais, carboidratos totais e lipídeos totais das microalgas *Isochrysis aff. galbana* e *Pavlova lutheri* nos dias 12 e 24 de cultivo para cada tratamento do semicontínuo (30, 50 e 70%) e do estático alimentado.

Microalga/ colheitas	Proteínas totais (%)					Carboidratos totais (%)					Lipídeos totais (%)				
	Semicontínuo			Estático alimentado		Semicontínuo			Estático alimentado		Semicontínuo			Estático alimentado	
	30%	50%	70%	E12	E24	30%	50%	70%	E12	E24	30%	50%	70%	E12	E24
<i>I. aff. Galbana</i>															
T12	33,02	34,02	31,46	32,56	-	2,39	2,32	2,07	2,58	-	16,44	22,13	13,19	20,79	-
	$\pm 4,56$	$\pm 6,01$	$\pm 7,47$	$\pm 4,33$	-	$\pm 0,89$	$\pm 0,51$	$\pm 0,57$	$\pm 0,41$	-	$\pm 7,89$	$\pm 10,71$	$\pm 3,81$	$\pm 12,52$	-
T24	36,39	38,02	35,55	-	33,73	2,63	2,30	2,54	-	2,64	55,49	53,40	55,50	-	50,15
	$\pm 4,13$	$\pm 5,47$	$\pm 5,77$	-	$\pm 3,18$	$\pm 0,34$	$\pm 0,50$	$\pm 0,25$	-	$\pm 0,28$	$\pm 9,38$	$\pm 9,81$	$\pm 5,68$	-	$\pm 7,24$
<i>P. lutheri</i>															
T12	39,29	37,27	37,31	39,60	-	3,05	3,36	3,34	3,13	-	24,96	27,19	19,49	15,95	-
	$\pm 4,52$	$\pm 4,22$	$\pm 4,19$	$\pm 5,27$	-	$\pm 0,48$	$\pm 0,54$	$\pm 0,44$	$\pm 0,98$	-	$\pm 11,62$	$\pm 10,32$	$\pm 9,19$	$\pm 8,88$	-
T24	44,62	42,58	45,00	-	44,14	3,63	4,26	3,74	-	3,83	26,61	27,37	33,36	-	17,80
	$\pm 8,96$	$\pm 11,39$	$\pm 8,49$	-	$\pm 5,68$	$\pm 0,36$	$\pm 0,81$	$\pm 0,47$	-	$\pm 0,36$	$\pm 7,67$	$\pm 8,46$	$\pm 10,88$	-	$\pm 5,88$

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1. Densidade celular

Os sistemas de cultivo testados neste estudo não afetaram a densidade celular das microalgas na fase exponencial inicial de crescimento (até o 4º de cultivo; T4). Brown et al. (1993) observaram comportamento semelhante para as microalgas *Isochrysis* sp., *P. lutheri* e *N. oculata*, cultivadas com meio f/2, 12:12 h (claro:escuro), iluminação de irradiância PAR de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em sistema estático e semicontínuo.

Para a microalga *I. aff. galbana*, a densidade celular no sistema estático alimentado, a partir do 9º dia de cultivo, foi de 1.800×10^4 células.mL⁻¹, mantendo este valor até o término do experimento. Este valor foi superior ao obtido por Brown et al. (1993) que encontrou em seus estudos a densidade próxima a 700×10^4 células.mL⁻¹ cultivadas em sistema estático. Resultados inferiores de densidade celular também foram observados para a microalga *I. aff. galbana* por Pernet et al. (2003), o qual apesar de utilizar iluminação constante (24h), alcançou valores de 1.200×10^4 células.mL⁻¹, utilizado meio f/2 com temperatura controlada de 19°C . A maior densidade celular observada neste estudo no sistema estático, pode estar relacionada ao processo de enriquecimento (adição de nutrientes) a cada 6 dias no cultivo e com a tipo de meio de cultura utilizado.

A quantidade de nitrogênio parece afetar mais a densidade celular que os outros parâmetros. Fidalgo et al. (1998) observaram para a microalga *I. aff. galbana* densidades celulares maiores ($2.300 - 2.900 \times 10^4$ células.mL⁻¹) de acordo com a fontes de nitrogênio utilizadas (Nitrito, Nitrato e Uréia) em uma concentração de $4 \text{ mg atom N.L}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 h com irradiância PAR de $115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A concentração de nitrogênio utilizada por Fidalgo et al. (1998) foram superiores aquelas utilizadas no meio Conway no presente estudo.

No sistema semicontínuo, a densidade celular da microalga *I. aff. galbana* nos tratamentos 30% e 50%, a partir da sua segunda colheita (8º dia de cultivo), apresentaram valores próximos a 1.000×10^4 células.mL⁻¹ em suas colheitas. Estes valores obtidos foram maiores que os descritos nas colheitas de Brown et al. (1993), que circundaram 400×10^4 células.mL⁻¹, onde usaram, além do menor fotoperíodo, uma única taxa de colheita de 15% a cada 2 dias. Interessantemente, Pernet et al. (2003) observaram valores de densidade celular semelhantes ao presente estudo, utilizaram uma taxa de colheita de 50% a cada 2 dias de cultivo, o mesmo fotoperíodo (24h), contudo com meio de cultura diferente (f/2).

Para a microalga *I. aff. galbana* em sistema semicontínuo, ocorreu reflexo entre a densidade celular e a taxa de colheita, os tratamentos 30 e 50% mantiveram uma densidade celular mais estáveis e próximas ao valor obtido na 1ª colheita (T4), enquanto o tratamento 70% apresentou valores decrescentes a partir da 3ª colheita (T12).

Para a microalga *Pavlova lutheri* os valores de densidade celular foram crescentes em ambos os sistemas de cultivo, chegando ao máximo de 3.299×10^4 células.mL⁻¹ nos sistemas estático alimentado e de 1.776×10^4 células.mL⁻¹ no sistema semicontínuo, com colheita de 30%.

Em seu sistema semicontínuo, Brown et al. (1993) relataram densidades celulares inferiores à 600×10^4 células.mL⁻¹ para a microalga *Pavlova lutheri*.

Utilizando uma combinação de sistemas estático até o 19º dia com o aumento gradativo da irradiância PAR num fotoperíodo constante (24 h) e a partir do 20º dia semicontínuo, com uma taxa diária de colheita de 20%, Ponis et al. (2008) obtiveram densidades celulares acima dos 12.000×10^4 células.mL⁻¹ com a microalga *Pavlova lutheri*.

Para a microalga *Pavlova lutheri* também apresentou a relação entre a densidade celular e a taxa de colheita no sistema semicontínuo, onde os 30 e 50% apresentaram valores mais próximos entre as colheitas. Contudo por esta não ter estabilizado os valores de densidade celular neste estudo, não ficou tão evidente a diferenças entre os percentuais de colheita, como ocorrido com a microalga *I. aff. galbana*.

2.4.2. Produção de biomassa seca

No cultivo da microalga *I. aff. galbana* a produção de biomassa seca (mg.L⁻¹) avaliada no 12º dia não diferiu entre os tratamentos do estático alimentado e do sistema semicontínuo, obtendo valores próximos à 255,00 mg.L⁻¹.

No estudo de Brown et al. (1993) apresentaram outro indicador de produtividade diária (mg.L⁻¹.dia⁻¹) onde também não apresentou diferenças entre os sistemas semicontínuo e estático de cultivo para a *I. aff. galbana* com valores próximos à 14 mg.L⁻¹.dia⁻¹.

No 24º dia de cultivo a produção em biomassa seca do sistema estático alimentado para a *I. aff. galbana* diferiu dos demais tratamentos, sendo superior ($499,45 \pm 79,96$ mg.L⁻¹) a produção em biomassa nos tratamentos do sistema semicontínuo, cerca de 139,00 mg.L⁻¹. Esta diferença deve-se ao fato do sistema estático alimentado ter estabilizado a densidade celular em valores próximos ao dobro dos valores relatados no sistema semicontínuo em sua última colheita.

Em ambos os dias, 12 e 24, para a *I. aff. galbana* no sistema semicontínuo o tratamento 30% apresentou maior valor de produtividade (mg.L^{-1}), porém ao relacionarmos o volume de colheita e a produção, o tratamento 50% apresentou biomassa colhida final maior que o tratamento 30%.

A produção em biomassa seca encontrada nos cultivos da microalga *P. lutheri* em ambos os dias, 12 e 24, no sistema estático alimentado, próximos a 445 mg.L^{-1} , foram superiores aos encontrados no sistema semicontínuo, onde o maior valor ($271,33 \text{ mg.L}^{-1}$) foi obtido no tratamento 30% do sistema semicontínuo no 24º dia de cultivo.

Nos estudos de Brown et al. (1993), os índices de produção diária para a microalga *P. lutheri* não apresentaram diferenças entre o sistema contínuo e estático, com valores próximos à $15 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Ponis et al. (2008) relataram produtividades diárias ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para *P. lutheri* superiores as descritas por Brown et al. (1993), chegando a $0,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, devido ao seu sistema semicontínuo iniciar as suas colheitas após o 19º dia, onde a biomassa de seu sistema atingiu uma produção de biomassa de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Para *P. lutheri*, o tratamento 30% do semicontínuo apresentou maiores valores de produção de biomassa seca (mg.L^{-1}) em relação aos demais tratamentos do mesmo sistema. Porém ao relacionarmos a produtividade e o volume de colheita, no 12º dia de cultivo o tratamento 50% apresentou uma biomassa colhida final maior que o tratamento 30%, já no 24º dia de cultivo, o tratamento 30% resultou em maior produção de biomassa colhida final.

2.4.3. Peso seco celular

Para a microalga *I. aff. galbana*, os valores de peso seco celular obtidos no sistema estático alimentado foram diferentes para o 12º e 24º de cultivo, apresentado 13,61 e 28,26 pg.célula^{-1} , respectivamente. Contudo estes valores não apresentaram diferenças aos encontrados no tratamento 50% do semicontínuo, que apresentou valores, em ambas as datas, próximos à $20,00 \text{ pg.célula}^{-1}$.

O valor de peso seco celular descritos por Renaud et al. (1995) para a microalga *Isochrysis* sp. cultivada em sistema estático nas temperaturas de 15, 20 e 25°C, utilizando meio f/2, iluminação 12:12 h com irradiância PAR de $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, são próximos aos encontrados neste estudo, variando entre 15,0 – 21,0 pg.célula^{-1} .

Os tratamentos do sistema semicontínuo não diferiram entre si, porém, apresentaram valores maiores no 12º dia de cultivo para o peso seco celular da microalga *I. aff. galbana*, com exceção do tratamento 50% que apresentou valores próximos no 12º e 24º dia de cultivo.

Os valores de peso seco celular da *P. lutheri* encontrados no 12º dia de cultivo apresentaram diferenças entre os sistemas, no sistema estático alimentado o maior valor foi de 30,7 pg.célula⁻¹. No sistema semicontínuo apresentou os valores de 19,76, 14,91, 16,20 pg.célula⁻¹ para os tratamentos 30%, 50% e 70%, respectivamente.

Para a *P. lutheri*, os valores de peso seco celular encontrados em T12 no sistema semicontínuo indicam o efeito das 3 colheitas realizadas, onde ocorreu uma renovação celular maior, enquanto no estático alimentado, a mesma célula manteve-se estável e acumulando mais biomassa.

O sistema estático alimentado utilizado neste estudo apresentou valores de peso seco celular próximos ao encontrado por Fernández-reiriz et al. (1989) durante a fase exponencial de seu cultivo em sistema estático, apresentando o valor de 29,6 pg.célula⁻¹ para a *P. lutheri*. Estes também foram inferiores aos relatados por Brown et al. (1993) foram durante as fases e sistemas por estes testados, ficando próximos à 35,0 pg.célula⁻¹.

No 24º dia de cultivo, o menor valor de peso seco celular da *P. lutheri* foi obtido no tratamento 70% do semicontínuo com 6,6 pg.célula⁻¹, diferindo dos demais, que apresentaram valores entre 8,6 – 15,4 pg.célula⁻¹. Estes valores foram inferiores aos descritos para *P. lutheri* por Fernández-reiriz et al. (1989) e Brown et al. (1993) em seus estudos, o que ressalta a relação inversa com a densidade celular, onde ambos os estudos apresentaram valores maiores de peso seco celular e menores densidades.

No sistema semicontínuo, após a colheita e reposição de meio, o tratamento 70% foi o que apresentou maior recuperação em densidade celular para a *P. lutheri*, o que acarretou em uma menor biomassa de cada microalga neste tratamento no final de cultivo (T24).

2.4.4. Proteínas, carboidratos e lipídeos totais

A composição química das microalgas *I. aff. galbana* e *P. lutheri* não apresentaram diferenças entre as porcentagens de colheita testadas e os sistemas testados (semicontínuo e estático alimentado) em ambos dias analisados (T12 e T24).

Os teores de proteínas totais para a microalga *I. aff. galbana* obtidos nos dias analisados (T12 e T24) oscilaram entre 31 e 38% valores próximos aos descritos por Fernández-reiriz et al. (1989) para *I. galbana* e Brown et al. (1993) para *Isochrysis* sp., onde os percentuais

proteicos foram de 40% durante a fase exponencial e de 25% durante a fase de estabilidade do cultivo em sistema estático.

Os valores descritos por Brown et al. (1993) para proteínas totais da *Isochrysis* sp. para o sistema semicontínuo, durante a mesma fase exponencial de crescimento foi de 25%.

Fidalgo et al. (1998) apresentaram teores de proteínas totais da *I. galbana* entre 37 – 45% na fase exponencial de acordo com a fonte de nitrogênio, já na fase de estabilidade de cultivo, os valores foram próximos a 35% e no final da fase de estabilidade apresentaram entre 28 – 34% no cultivo em sistema estático.

Para a microalga *P. lutheri* os percentuais de proteínas totais não apresentaram diferenças entre os tratamentos e sistemas de cultivo em ambos os dias testados, 12º e 24º dia de cultivo, apresentando valores próximos a 39% e 44% respectivamente.

Fernández-reiriz et al. (1989) apresentaram o valor de 43% de proteínas totais para a fase estacionária no cultivo estático da *P. lutheri*, percentual próximo ao encontrado neste estudo.

Nos estudos de Brown et al. (1993) relataram valores próximos a 25% de proteínas totais para as fases exponencial em sistema semicontínuo e estabilidade em sistema estático, valores inferiores aos encontrados neste estudo.

Contudo, convém ressaltar que nos estudos de Fernández-reiriz et al. (1989) e Brown et al. (1993) utilizaram sistema estático onde, após certo período de cultivo, ocorre a limitação do nitrogênio para o cultivo, acarretando na redução dos índices de proteínas no fim do cultivo. Nosso estudo utilizou o sistema estático alimentando, com reposições de nutrientes a cada 6 dias, no qual não há a limitação de nitrogênio ao longo do tempo no sistema estático.

Para carboidratos totais na microalga *I. aff. galbana* os percentuais obtidos em ambas as datas (T12 e T24) e sistemas de cultivo ficaram próximos a 2,4%, valor bem inferior aos observados por Fernández-reiriz et al. (1989), os quais variaram de 15,2 a 48,4% de acordo com a fase de crescimento das microalgas. Para *Isochrysis* sp., Brown et al. (1993) também observaram valores de carboidratos totais superiores ao presente estudo, com menor valor próximo a 10,0% durante a fase exponencial em cultivo estático. Fidalgo et al. (1998) relataram valor mínimo de carboidratos totais de 7,6% para a *I. galbana* cultivada em sistema estático com Nitrato, mesmo componente do meio Conway utilizado no presente estudo.

Estes resultados indicam que o percentual de carboidrato tenha relação com a iluminação, seja esta traduzida em fotoperíodo ou intensidade da irradiância PAR, pois Brown et al. (1993) e Fidalgo et al. (1998) utilizaram fotoperíodo de 12:12 h com irradiância próximas à $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Já no estudo de Fernández-reiriz et al. (1989) o fotoperíodo foi constante,

idêntico ao utilizado neste estudo, porém com irradiância PAR de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, muito inferior os $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ utilizados no presente estudo.

Os baixos valores de carboidrato obtidos no presente estudo podem estar relacionados a intensidade luminosa (medida em PAR), a qual estimulou uma atividade intensa biológica, acelerando o seu metabolismo e consumindo grande parte de toda a glicose (carboidrato) produzida pela fotossíntese, não gerando reservas de carboidrato na célula. Por outro lado, esta mesma intensidade luminosa pode estar causando a foto inibição das células, o que reduz a atividade fotossintética e com isso a baixa produção de glicose pela célula algal.

Outra característica também observada nos estudos de Brown et al. (1993) e Fernández-reiriz et al. (1989) é o maior acúmulo de carboidrato ao longo do tempo, apresentado valores percentuais maiores na fase final de cultivo em comparação a fase exponencial, comportamento que neste estudo não apresentou.

Para a microalga *P. lutheri* os teores de carboidratos totais também não apresentaram diferenças entres os sistemas e tratamentos testados, com médias próximas a 3,5% para ambas as datas analisadas (T12 e T24). Fernández-reiriz et al. (1989) descreveram para *P. lutheri* cultivada em sistema estático, teores de carboidratos totais que variaram de 15 – 53% de acordo com a fase de crescimento. Os valores de carboidratos totais descritos por Brown et al. (1993) variaram entre 10 – 30% de acordo com a fase de crescimento e o sistema de cultivo.

Assim como no cultivo da *I. aff. galbana*, a microalga *P. lutheri* os valores de carboidratos foram inferiores aos descritos por Fernández-reiriz et al. (1989) e por Brown et al. (1993), o que se deu devido a intensidade da iluminação PAR utilizada neste estudo. Outro fator que pode ter contribuído para estes baixos percentuais foi que, em nenhum dos sistemas utilizados, a microalga atingiu a fase de estabilidade de crescimento, reforçando a intensa atividade biológica.

Os valores de lipídeos totais para a microalga *I. aff. galbana*, não diferiram entre os sistemas e tratamentos testados, no 12º dia de cultivo (T12) variaram de 13,1 a 22,1%, ficaram próximos ao valor de 15% descrito por Brown et al. (1993) em ambas as fases de crescimento e sistemas de cultivo. Nos cultivos de Fidalgo et al. (1998) com a *I. galbana* apresentaram ao utilizarem Nitrato como fonte de nitrogênio o valor de 22% de lipídeos totais durante a fase exponencial de crescimento.

Os valores obtidos no 24º dia de cultivo (T24) para *I. aff. galbana* também não apresentaram diferenças e foram superiores aos T12, variando entre 50,1 e 55,5%. Estes valores foram maiores que os apresentados por outros autores. Fernández-reiriz et al. (1989), que

apresentaram valores entre 25 – 36%, Brown et al. (1993), relatados valores próximos a 15% e Fidalgo et al. (1998), com valores entre 22 – 32%.

Este comportamento de acúmulo de lipídeos ao longo do tempo já havia sido relatado por Fernández-reiriz et al. (1989) no cultivo em sistema estático e foi o inverso do encontrado por Brown et al. (1993) em sistema semicontínuo onde, para a *Isochrysis* sp no 15º dia apresentaram cerca de 19% e no 31º dia este percentual de lipídeos caiu para 14%.

Este elevado acúmulo que ocorreu em nosso estudo, se comparado ao de Fernández-reiriz et al. (1989), pode ser uma resposta de defesa para o alto valor da iluminação PAR utilizada, fazendo com que estes lipídeos protegessem as organelas fotossintéticas da microalga.

Outros autores descreveram acúmulo ao longo do tempo de cultivo de lipídeos totais, como por exemplo, os de Pernet et al. (2003) em com a *I. galbana* e de Benvenuti et al. (2016) no cultivo de *Nannochloropsis* sp. em sistema semicontínuo.

Os teores de lipídeos totais encontrados nos cultivos da microalga *P. lutheri* não apresentaram diferenças entre os tratamentos e sistemas, apresentando valores próximos a 17% para o sistema estático alimentado e de 26% para o sistema semicontínuo em ambas as datas analisadas (T12 e T24). Estes valores foram inferiores aos valores reportados por Fernández-reiriz et al. (1989) para o sistema estático, cujo variaram entre 28 – 38%.

Os valores de lipídeos descrito por Brown et al. (1993) para a *P. lutheri* durante a fase de estabilidade em sistema estático e semicontínuo que foram cerca de 16%, próximos aos do encontrado no sistema estático alimentado.

Diferentemente da microalga *I. aff. galbana*, a *P. lutheri* apresentou valores mais constantes entre os dias analisados, não apresentando a tendência acentuada de acúmulo de lipídeo. Este fato pode ter-se dado devido ao cultivo não ter alcançado a fase de estabilidade, mantendo o comportamento da fase exponencial durante todo o cultivo.

2.5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste estudo, para a produção de biomassa algal, recomenda-se a colheita de 50% do volume de cultivo em sistema semicontínuo a cada 4 dias para a microalga *I. galbana*. Este procedimento levou a maior produção de biomassa algal final.

Já para a microalga *P. lutheri*, considerando o mesmo sistema de cultivo, com foco na produção de biomassa algal final recomenda-se a colheita de 30% do volume de cultivo, o qual obteve a maior produção.

Para ambas as microalgas estudadas, os diferentes percentuais de colheita não afetaram as suas composições químicas, garantindo a mesma qualidade nutricional da microalga ao longo do cultivo.

2.6. REFERÊNCIAS DO ARTIGO

BENEMANN, John R.. Microalgae aquaculture feeds. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.233-245, set. 1992. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02161209>;

BENVENUTI, Giulia et al. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.3167-3177, 7 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0897-1>;

BOROWITZKA, Michael A.. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.393-401, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007921728300>;

BOROWITZKA, Michael A.. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.313-321, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00083-8);

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.557-577, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>;

BROWN, M. R. et al. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.285-296, jun. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02186231>;

BROWN, Malcolm; ROBERT, René. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, [s.l.], v. 207, n. 3-4, p.289-309, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00742-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00742-6);

CANCELA, A. et al. Harvesting and lipids extraction of *Pavlova Lutheri*. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1842-1847, 9 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ep.12411>;

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>;

CRESWELL, Leroy. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. **Southern Regional Aquaculture Center**, Estados Unidos, n. 5008, p.1-13, 1 out. 2010. Mensal. Disponível em: <<http://agrilifecdn.tamu.edu/fisheries/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-5004-Phytoplankton-Culture-for-Aquaculture-Feed.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016;

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.1959-1967, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>;

DUBOIS, Michel. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.350-356, mar. 1956. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>;

EMDADI, D.; BERLAND, B.. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.215-225, abr. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203\(89\)90004-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203(89)90004-2);

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>, acessado em 04 set. 2016;

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**, [s.l.], v. 83, n. 1-2, p.17-37, dez. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90057-4](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(89)90057-4);

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V.. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Rev. de Ciências Agrárias** [online]. 2013, vol.36, n.3, pp. 275-287. ISSN 0871-018X. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v36n3/v36n3a01.pdf>, acessado em 06 set. 2015;

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**, [s.l.], v. 166, n. 1-2, p.105-116, jul. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00278-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00278-6);

FOLCH, Jordi, et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957;

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). PRODUÇÃO DE PECUÁRIA MUNICIPAL 2014. 2015. Disponível em: http://downloads.ibge.gov.br/downloads_estatisticas.htm, acessado em 04 out. 2015;

JAMES, Charles M.; AL-KHARS, A.m.. An intensive continuous culture system using tubular photobioreactors for producing microalgae. **Aquaculture**, [s.l.], v. 87, n. 3-4, p.381-393, jun. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90075-x](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90075-x);

JEREZ, Cg et al. Hydrodynamics and photosynthesis performance of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in a thin-layer cascade (TLC) system. **Aquatic Biology**, [s.l.], v. 22, p.111-122, 20 nov. 2014. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/ab00603>;

KANG, Juhyon; WEN, Zhiyou. Use of microalgae for mitigating ammonia and CO₂ emissions from animal production operations — Evaluation of gas removal efficiency and algal biomass

composition. **Algal Research**, [s.l.], v. 11, p.204-210, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.020>;

LIN, Yen-hui et al. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.166-176, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.04.014>;

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J.. Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 306, n. 1, p.1-6, jun. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00007853>;

LOURENÇO, Sérgio O.. **Cultivo de Microalgas Marinhas Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. 606 p;

LOWRY, O. H.; et al. . Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275. 1951;

MAITY, Jyoti Prakash et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, [s.l.], v. 78, p.104-113, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.003>;

MARCHETTI, J. et al. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. **Aquaculture**, [s.l.], v. 326-329, p.106-115, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.020>;

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.217-232, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>;

PATIL, Vishwanath et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. **Aquaculture International**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-9, 27 jul. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>;

PERNET, Fabrice et al. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**, [s.l.], v. 221, n. 1-4, p.393-406, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00030-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00030-9);

POLI, Carlos Rogério et al (Org.). **Aquicultura Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multifaera Editora Ltda, 2004. 456 p;

PONIS, E. et al. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture**, [s.l.], v. 282, n. 1-4, p.97-103, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.010>;

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.595-602, dez. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00003948>;

RICHMOND, A.. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford, Blackwell Science, 2004. 566p;

RICO-VILLA, B. et al. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, [s.l.], v. 256, n. 1-4, p.377-388, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.015>;

SILVA, Francisco Carlos da et al. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, Carlos Rogério et al (Org.). **Aquicultura Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa Editora Ltda, 2004. Cap. 5. p. 93-120;

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei dal; COLLA, Luciane Maria. APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE MICROALGAS. **Revista Ciatic-upf**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.48-60, 18 ago. 2012. UPF Editora. <http://dx.doi.org/10.5335/ciatic.v4i1.2393>;

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial applications of microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.87-96, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.101.87>;

SUKENIK, Assaf; WAHNON, Rachel. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 97, n. 1, p.61-72, set. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90279-g](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90279-g);

VOLKMAN, J.k. et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [s.l.], v. 128, n. 3, p.219-240, jun. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4);

ZHU, C. J.; LEE, Y. K.; CHAO, T. M.. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.451-457, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007973319348>.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a realização deste estudo, ocorreram testes no primeiro semestre de 2016 com quatro espécies de microalgas utilizadas na alimentação de moluscos bivalves produzido no LMM, sendo duas espécies de microalgas flageladas (*I. galbana* e *P. lutheri*) e outras duas diatomáceas (*Chaetoceros calcitrans* e *Chaetoceros muelleri*) em sistema semicontínuo por um período 28 dias, com colheitas a cada 4 dias a partir da inoculação nas mesmas proporções apresentas.

Destes experimentos, o cultivo das flageladas obteve sucesso parcial, onde ocorreram contaminações por outros organismos, o que revelou a necessidade de se melhorar o desenho experimental. Já para as diatomáceas, em nenhuma das espécies obtivemos êxito no cultivo.

No redesenho experimental, a inserção do tratamento estático alimentado como controle para comparação da composição química destas algas se mostrou importante, mesmo no final revelando que não houve diferenças neste parâmetro entre os diferentes sistemas de cultivos.

Outro ponto importante a ser ressaltado é a importância da homogeneização do cultivo para evitar o surgimento de grumos de microalgas no fundo dos recipientes, o que foi observado nos testes iniciais e que devido ao surgimento, estes serviram de substrato para o crescimentos de outros organismos prejudiciais ao cultivo.

Como demonstrado neste estudo, o sistema de cultivo semicontínuo que praticamos no LMM é bem efetivo para a microalga *I. galbana*, porém deixou claro que podemos aproveitar melhor o potencial da *P. lutheri* além de termos que aprofundar mais nos estudos com as demais espécies de microalgas utilizadas na alimentação dos bivalves.

4. REFERÊNCIAS

- BENEMANN, John R.. Microalgae aquaculture feeds. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.233-245, set. 1992. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02161209>;
- BENVENUTI, Giulia et al. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.3167-3177, 7 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0897-1>;
- BOROWITZKA, Michael A.. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.393-401, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007921728300>;
- BOROWITZKA, Michael A.. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.313-321, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00083-8);
- BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.557-577, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>;
- BROWN, M. R. et al. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.285-296, jun. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02186231>;
- BROWN, Malcolm; ROBERT, René. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, [s.l.], v. 207, n. 3-4, p.289-309, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00742-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00742-6);
- CANCELA, A. et al. Harvesting and lipids extraction of *Pavlova Lutheri*. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1842-1847, 9 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ep.12411>;
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>;
- CRESWELL, Leroy. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. **Southern Regional Aquaculture Center**, Estados Unidos, n. 5008, p.1-13, 1 out. 2010. Mensal. Disponível em: <<http://agrifecdn.tamu.edu/fisheries/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-5004-Phytoplankton-Culture-for-Aquaculture-Feed.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016;
- DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.1959-1967, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>;

DUBOIS, Michel. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.350-356, mar. 1956. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>;

EMDADI, D.; BERLAND, B.. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.215-225, abr. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203\(89\)90004-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203(89)90004-2);

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>, acessado em 04 set. 2016;

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**, [s.l.], v. 83, n. 1-2, p.17-37, dez. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90057-4](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(89)90057-4);

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V.. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Rev. de Ciências Agrárias** [online]. 2013, vol.36, n.3, pp. 275-287. ISSN 0871-018X. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v36n3/v36n3a01.pdf>, acessado em 06 set. 2015;

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**, [s.l.], v. 166, n. 1-2, p.105-116, jul. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00278-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00278-6);

FOLCH, Jordi, et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957;

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). PRODUÇÃO DE PECUÁRIA MUNICIPAL 2014. 2015. Disponível em: http://downloads.ibge.gov.br/downloads_estatisticas.htm, acessado em 04 out. 2015;

JAMES, Charles M.; AL-KHARS, A.m.. An intensive continuous culture system using tubular photobioreactors for producing microalgae. **Aquaculture**, [s.l.], v. 87, n. 3-4, p.381-393, jun. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90075-x](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90075-x);

JEREZ, Cg et al. Hydrodynamics and photosynthesis performance of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in a thin-layer cascade (TLC) system. **Aquatic Biology**, [s.l.], v. 22, p.111-122, 20 nov. 2014. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/ab00603>;

KANG, Juhyon; WEN, Zhiyou. Use of microalgae for mitigating ammonia and CO₂ emissions from animal production operations — Evaluation of gas removal efficiency and algal biomass composition. **Algal Research**, [s.l.], v. 11, p.204-210, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.020>;

LIN, Yen-hui et al. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. **Biochemical Engineering Journal**,

[s.l.], v. 37, n. 2, p.166-176, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.04.014>;

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J.. Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 306, n. 1, p.1-6, jun. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00007853>;

LOURENÇO, Sérgio O.. **Cultivo de Microalgas Marinhas Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. 606 p;

LOWRY, O. H.; et al. . Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275. 1951;

MAITY, Jyoti Prakash et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, [s.l.], v. 78, p.104-113, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.003>;

MARCHETTI, J. et al. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. **Aquaculture**, [s.l.], v. 326-329, p.106-115, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.020>;

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.217-232, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>;

PATIL, Vishwanath et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. **Aquaculture International**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-9, 27 jul. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>;

PERNET, Fabrice et al. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**, [s.l.], v. 221, n. 1-4, p.393-406, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00030-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00030-9);

POLI, Carlos Rogério et al (Org.). **Aquicultura Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multifaera Editora Ltda, 2004. 456 p;

PONIS, E. et al. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture**, [s.l.], v. 282, n. 1-4, p.97-103, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.010>;

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.595-602, dez. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00003948>;

RICHMOND, A.. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford, Blackwell Science, 2004. 566p;

RICO-VILLA, B. et al. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, [s.l.], v. 256, n. 1-4, p.377-388, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.015>;

SILVA, Francisco Carlos da et al. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, Carlos Rogério et al (Org.). **Aquicultura Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa Editora Ltda, 2004. Cap. 5. p. 93-120;

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei dal; COLLA, Luciane Maria. APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE MICROALGAS. **Revista Ciatec-upf**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.48-60, 18 ago. 2012. UPF Editora. <http://dx.doi.org/10.5335/ciatec.v4i1.2393>;

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial applications of microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.87-96, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.101.87>;

SUKENIK, Assaf; WAHNON, Rachel. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 97, n. 1, p.61-72, set. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90279-g](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90279-g);

VOLKMAN, J.k. et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [s.l.], v. 128, n. 3, p.219-240, jun. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4);

ZHU, C. J.; LEE, Y. K.; CHAO, T. M.. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.451-457, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007973319348>.