

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MICROALGAS
MARINHAS CULTIVADAS EM LABORATÓRIO**

Tese apresentada pelo Doutorando
Alfredo Matos Moura Junior ao Programa
de Pós-Graduação em Botânica da
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Botânica.

Orientador:
Dr. Egídio Bezerra Neto

Conselheiras:
Dra. Enide Eskinazi Leça
Dra. Maria Luise Koenig

RECIFE
2002

Catálogo na fonte
Setor de Processos técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

Moura Junior, Alfredo Matos

Composição química de microalgas marinhas cultivadas
em laboratório / Alfredo Matos Moura Junior. – 2002.

113 p. : il.

Orientador : Egídio Bezerra Neto

Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural
de Pernambuco.

Departamento de Botânica.

Inclui bibliografia e anexo

CDD 589.3

1. BIOQUÍMICA
2. MICROALGAS
3. BRASIL, NORDESTE
 - I. Bezerra Neto, Egídio
 - II. Título

581

650. Botânica

29 cm.

Microalgas
composição química

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MICROALGAS MARINHAS CULTIVADAS EM LABORATÓRIO

ALFREDO MATOS MOURA JUNIOR

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora:

Orientador: _____

✓ Dr. Egídio Bezerra Neto

Examinadores:

Dra. Ângela Maria Vieira Batista

Dra. Ariadne do Nascimento Moura

Dr. Francisco Fernando Ramos de Carvalho

Dra. Helena Simões Duarte

Dr. Roberto Sassi

Data de aprovação: 21/06/2002

Recife
2002

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), na pessoa do seu Ex-Coordenador Prof. Valmar Correia de Andrade e atual Coordenadora, Profa. Sonia Maria Barreto Pereira, pelo apoio e incentivo recebido durante o período do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante os anos de 1999 e 2000.

Aos Departamentos de Oceanografia e Geologia da Universidade Federal de Pernambuco, pela permissão na utilização dos laboratórios para a realização dos experimentos de cultivo.

À Empresa Aqualider, pela parceria, liberação das cepas necessárias aos experimentos de cultivo e utilização de suas instalações.

Ao orientador, Dr. Egídio Bezerra Neto, pela paciência, conselhos e ensinamentos.

À Dra. Maria Luise Koenig, pela ajuda, amizade, confiança, conselhos e eficiente orientação neste e em futuros trabalhos.

À Dra. Enide Eskinazi Leça, pelos conselhos e orientação deste e de futuros trabalhos.

Ao Prof. Roberto Sassi, da Universidade Federal da Paraíba, pela amizade, conselhos, críticas e sugestões nos trabalhos.

À Dra. Ariadne do Nascimento Moura, da UFRPE, pelo convívio, amizade e sugestões na redação da Tese.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRPE, pelos ensinamentos, conselhos e convívio durante todo o período de estudo.

Ao Dr. Marcos Correia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, pelo incentivo, conselhos e utilização do laboratório.

Aos amigos Paula Nascimento, Gladistone dos Santos, Fátima Carvalho (mamãe), Nadja Oliveira, Alexandre Pires e Maria das Dores pelos bons momentos nos laboratórios 08 e 09 do PPGB.

Aos amigos Gibson Gomes e Edmilson Ramos pelos bons momentos durante todo o curso.

À Dra. Maria da Gloria Gonçalves da Silva Cunha, à MSc. Adilma Cocentino e à Dra. Maria Elisabeth Pedrosa, pelas conversas e conselhos durante os anos de 1996 a 2002.

À minha esposa, Karine Matos Magalhães, pelo incentivo, ajuda, carinho e paciência, e ao meu filhote Caio Magalhães Moura, pelo carinho para a conclusão deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies de microalgas cultivadas para fins econômicos.	24
Tabela 2 - Aplicação comercial dos produtos extraídos de microalgas cultivadas.	29
Tabela 3 - Valor de venda, quantidade comercializado, valor de mercado e fontes alternativas aos produtos de algas.	30
Tabela 4 - Valor estimado da biomassa, baseado nos valores de produtos e conteúdo celular.	30

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivo Geral	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Cultivo	19
2.2 Composição química	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
4 TRABALHOS	43
4.1 Composição química de <i>Chaetoceros gracilis</i> Schut., <i>Isochrysis galbana</i> Parke e <i>Thalassiosira weissflogii</i> (Grunow) G. Fryxell & Hasle cultivadas em garrafão de vidro.	44
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	52
LITERATURA CITADA	53
4.2 Composição química de <i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt, <i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Eimann & Lewin e <i>Tetraselmis gracilis</i> (Kyllin) Butcher, em condição de cultivo semi-extensivo.	57
Introdução	59
Material e Métodos	59
Resultados	61
Discussão	62
Conclusões	65

Referências bibliográficas	65
5 DISCUSSÃO GERAL	68
5.1 Conclusões	82
5.2 Perspectivas futuras	83
5.3 Referências Bibliográficas	84
ANEXOS	88

RESUMO

Foi determinada a composição química das microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* e *Thalassiosira weissflogii*, com a finalidade principal de fornecer dados para orientação a aqüicultores, uma vez que o valor nutricional dessas microalgas, utilizadas como alimento para os animais cultivados, ainda é pouco conhecido no Nordeste do Brasil. *C. gracilis*, *C. closterium* e *T. gracilis* foram cultivadas em temperatura constante de 20°C, até atingirem o volume de 8 litros em garrações de vidro, repicadas a cada oito dias e aeradas a partir de 1 litro, na Universidade Federal de Pernambuco e *C. gracilis*, *I. galbana* e *T. weissflogii* foram cultivadas em temperatura constante de 18°C, até atingirem o volume de 20 litros em sacos plásticos, repicadas a cada dois dias e aeradas a partir de 0,5 litro, na Empresa Aqualider. Ambos experimentos foram realizados sob iluminação constante, em meio F2 – Guillard. As análises foram realizadas no início da fase exponencial, para o cultivo em saco plástico, e no final da fase exponencial, para o cultivo em garrafão de vidro. Em relação ao cultivo em saco de plástico, *I. galbana* apresentou a maior densidade celular (3.295×10^6 cel L⁻¹) com diferença significativa superior as demais espécies, o maior teor de carboidratos solúveis (0,09 mg L⁻¹), seguida por *C. gracilis* (0,06 mg L⁻¹) e por *T. weissflogii* (0,05 mg L⁻¹), também com diferenças significativas entre as três espécies e os maiores teores de nitrato, fósforo e magnésio com diferenças significativas superiores as demais espécies, enquanto que *T. weissflogii* apresentou os maiores valores para sódio, potássio e enxofre. Em relação a clorofila *a*, *C. gracilis* apresentou o maior teor (3,74 mg L⁻¹), seguida por *I. galbana* (1,87 mg L⁻¹) e por *T. weissflogii* com o menor valor (0,96 mg L⁻¹), também com diferenças significativa entre as três espécies. Já para o cultivo

em garrafão de vidro, *C. gracilis* apresentou maiores valores para densidade celular, chegando a 8.447×10^6 cel L^{-1} ; para carboidrato solúvel ($0,10 \pm 0,009$ mg $\cdot L^{-1}$) e magnésio ($14,78$ mg $\cdot L^{-1}$). *C. closterium* apresentou a maior concentração para clorofila *a* ($13,76$ mg $\cdot L^{-1}$), proteína solúvel ($0,62$ mg $\cdot L^{-1}$), aminoácidos totais ($23,82$ mg $\cdot L^{-1}$), nitrato ($0,365$ mg $\cdot L^{-1}$), sódio ($0,46$ mg $\cdot L^{-1}$) e fósforo ($2,80$ mg $\cdot L^{-1}$). Os teores de potássio ($0,02$ mg L^{-1}) e enxofre ($0,03$ mg L^{-1}) foram iguais para *C. gracilis* e *C. closterium*. A espécie *T. gracilis* apresentou os menores valores nos parâmetros analisados. Devido a variação na composição química entre as espécies analisadas nos dois experimentos, sugere-se a utilização de dietas multiespecíficas para a alimentação animal, promovendo assim, melhor desenvolvimento destes, em um menor período de tempo.

Palavras Chaves: *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis*, *Thalassiosira weissflogii*, composição química.

ABSTRACT

The chemical composition of the microalgae *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* was determined aiming to provide data in order to orientate aquafarmers, since the nutritional value of these microalgae, used as food for the cultivated animals, is still little known in the Northeast of Brazil. At the Federal University of Pernambuco, *C. gracilis*, *C. closterium* and *T. gracilis* were grown at constant temperature of 20°C until reach the volume of 8 L, in carboys. The volume was increased and aerated from 1 L every eight days. At the Aqualider Company, *C. gracilis*, *I. galbana* and *T. weissflogii* were cultured at constant temperature of 18°C until reach the volume of 20 L in plastic bags, with the aeration starting from 0,5 L, and the volume increased every two days. Both experiments were carried out under continuous illumination, in F2 - Guillard medium. For the culture in plastic bags, the analyses were realized the beginning of the exponential phase and, for the cultures in carboys, at the end of the exponential phase. Regarding the cultures in plastic bags, *I. galbana* presented the highest cellular density (3.295×10^6 cell.L⁻¹), with significant difference superior to the other species, and the highest soluble carbohydrates level (0,09 mg.L⁻¹), followed by *C. gracilis* (0,06mg.L⁻¹) and *T. weissflogii* (0,05 mg.L⁻¹), also presenting significant differences among the three species, and the highest

values of nitrate, phosphorus and magnesium, with significant differences superior to the other species. *T. weissflogii* presented the highest values of sodium, potassium and sulfur. In relation to the chlorophyll *a*, *C. gracilis* presented the highest level (3,74 mg.L⁻¹), followed by *I. galbana* (1,87 mg.L⁻¹) and *T. weissflogii* (0,96 mg.L⁻¹), with significant differences among the three species. Concerning the cultures in carboys, *C. gracilis* presented the highest values for cellular density (8.447 x 10⁶ cell.L⁻¹), soluble carbohydrate (0,10± 0,009 mg.L⁻¹) and magnesium (14,78 mg.L⁻¹). *C. closterium* presented the highest concentration of chlorophyll *a* (13,76 mg.L⁻¹), soluble protein (0,62 mg.L⁻¹), total free amino acids (23,82 mg.L⁻¹), nitrate (0,365 mg.L⁻¹), sodium (0,46 mg.L⁻¹) and phosphorus (2,80 mg.L⁻¹). The potassium (0,02 mg.L⁻¹) and sulfur (0,03 mg.L⁻¹) contents were the same for *C. gracilis* and *C. closterium*. The species *T. gracilis* presented the lowest values concerning the analyzed parameters. Due to the variation of the chemical composition among the species analyzed in both experiments, we suggest the use of multispecific diets for the animal feeding, thus promoting its best development in a shorter period of time.

Key words: *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis*, *Thalassiosira weissflogii*, chemical composition.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas constituem um grupo de vegetais bastante variado e encontram-se classificadas em nove divisões, com cerca de 26.000 espécies conhecidas (Tomas, 1997). Essa elevada diversidade implica em grande variação metabólica entre as espécies, muitas delas produzindo várias substâncias de valor comercial, incluindo pigmentos, vitaminas, polissacarídeos, proteínas, produtos farmacêuticos e outros compostos biologicamente ativos (Borowitzka, 1999a e b).

Quanto aos pigmentos, além dos diversos tipos de clorofila que possuem (*a*, *b*, *c* e *d*) e que lhes conferem o papel de grandes produtoras dos ecossistemas aquáticos, as microalgas podem produzir também vários pigmentos acessórios, como as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina), além de carotenóides.

Em algumas espécies, esses pigmentos acessórios podem estar presentes em quantidades maiores do que a dos pigmentos primários, podendo-se citar, como exemplo, as clorofíceas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, as quais acumulam quantidades significativas de beta-carotenos (Bem-Amotz, 1999). A primeira espécie pode acumular cerca de 14 % de seu peso seco de beta-caroteno, quando cultivada em condições

apropriadas, como alta salinidade e quantidades altas de luz (Liaaen-Jensen & Egeland, 1999).

A concentração média de carotenóides em diversas classes de microalgas é cerca de 1 %. A aplicação comercial desses pigmentos é muito variada, sendo bastante utilizados como corantes de alimentos e como alimentação aditiva em cultivos de peixes salmonídeos (Borowitzka, 1988; Bem-Amotz, 1999; Liaaen-Jensen & Egeland, 1999).

Muitas espécies de microalgas produzem polissacarídeos e alguns desses compostos podem ser explorados economicamente. A rodofícea unicelular *Porphyridium cruentum* é considerada como uma das espécies mais promissoras neste contexto, pois em condições ideais de cultivo pode produzir grandes quantidades de polissacarídeos, contendo D-xilose, D-glucose e D-galactose, entre outros. Em outras algas, a acumulação de polissacarídeos pode ocorrer em apenas uma fase do ciclo de vida, como acontece com *Dunaliella tertiolectra*, *D. salina* e *Isochrysis galbana* (Guillard & Wangersky, 1958; Arad, 1999; Cohen, 1999).

A situação mais promissora no aproveitamento das microalgas é na produção de carboidratos e proteínas, considerando-se que algumas espécies podem conter em torno de 50 % de proteína, como tem sido evidenciado para várias espécies de *Scenedesmus*, *Spirulina* e *Dunaliella* (Becker, 1995).

Em virtude dessas características, o estudo bioquímico das microalgas tem despertado o interesse de vários pesquisadores, que vêm nesses

microvegetais uma fonte inesgotável de proteínas e outros derivados, como também seu aproveitamento no tratamento de águas e na aquicultura. O grande impulso nesses estudos ocorreu a partir da década de 1950, exatamente com a descoberta do elevado teor de beta-caroteno em *Dunaliella salina*, como também, de elevados teores de proteínas em diversas outras espécies (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Entretanto, a grande partida para o aprofundamento dos estudos sobre bioquímica de microalgas ocorreu com a publicação de Burlew (1953), que relatou o conteúdo de proteínas de diversas espécies de microalgas, complementado mais tarde com o livro editado por Shelef & Soeder (1980) que apresentaram as diversas aplicações e usos das microalgas em vários setores.

O interesse na produção comercial das microalgas e seu potencial econômico está se tornando largamente reconhecido, ainda que a produção em massa tenha surgido várias décadas depois que, os primeiros tanques de algas foram construídos. Em outras palavras, existe uma clara discrepância entre o reconhecido potencial de muitas espécies de microalgas e o atual desenvolvimento industrial. Duas das maiores razões para o lento progresso em culturas industriais são: o alto custo da produção e as dificuldades de popularização da biomassa algal. Como resultado desses problemas, até o presente, só alguns poucos produtos produzidos pelas microalgas têm obtido sucesso comercial, principalmente, quando se considera o aproveitamento das microalgas como alimento humano, existindo atualmente muitas espécies que esperam o reconhecimento de suas habilidades em produzir substância de importância econômica (Becker, 1995).

Para Borowitzka (1999a), apenas o fato de determinada espécie possuir capacidade de armazenar determinados produtos, não se constitui em espécie de valor econômico e, segundo o autor, uma espécie para ser considerada de importância econômica precisa ser avaliada dentro dos seguintes aspectos:

- 1 – ser capaz de crescer em condições ambientais extremas, pois, assim, reduz os problemas de competição entre espécies e com predadores;
- 2 – ter uma taxa de crescimento rápida, pois além de reduzir problemas com competidores, também propicia a diminuição da área do tanque de cultivo;
- 3 – ser bastante tolerante às características ambientais, diminuindo as condições de controle exigidas nesse tipo de cultivo;
- 4 – possuir altos percentuais do produto comercialmente desejado.

Por outro lado, os produtos sintetizados pelas algas também precisam ter algumas características para serem considerados comercialmente importantes, tais como:

- 1 – possuir alto valor comercial;
- 2 – não poder ser sintetizado quimicamente;
- 3 – ocorrer em maior teor nas algas, para que não haja outra fonte competidora;
- 4 – ser um produto estável, para que haja menor dificuldade na extração, purificação e estocagem.

Na realidade, nenhuma alga isoladamente ou o produto algal apresenta todos os critérios acima descritos, existindo poucos produtos de alto valor em uma única alga e/ou aqueles que são produzidos em larga escala pela alga. Consequentemente, um pequeno número de espécies de microalgas, entre as milhares já conhecidas, são utilizadas e cultivadas para fins comerciais, destacando-se, especialmente aquelas cujas técnicas de cultivos já estão perfeitamente dominadas.

Atualmente, uma das atividades na qual o aproveitamento comercial das microalgas tem apresentado um considerável aumento, é o cultivo em massa para fins de aquicultura, notadamente, quando se reconhece o valor das microalgas como fonte de alimento para vários organismos de importância econômica, como peixes, crustáceos e moluscos (De Pauw & Persoone, 1988).

- Vários trabalhos têm sido realizados para determinar a composição química das microalgas com o objetivo de produzir alimento direcionado às necessidades nutritivas dos animais criados em cativeiro (Whyte, 1987; Brown, 1991; Brown *et al.*, 1997, 1998; Lopes-Muñoz *et al.*, 1992; O'Connor *et al.* 1992; Southgate *et al.*, 1998; Caers *et al.*, 1999), e também, relacionados à variação da constituição química das microalgas em relação ao meio nutritivo no qual estão sendo cultivadas (Antia *et al.*, 1977; Goldman, 1980; Fabregas *et al.*, 1985a, 1985b, 1986; Nelson *et al.*, 1992; Melo *et al.*, 1993; Sukenik *et al.*, 1993; Lourenço *et al.*, 1997; Fidalgo *et al.*, 1998; Sauodis-Helis *et al.*, 1999; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

O cultivo de microalgas é uma atividade bastante desenvolvida no Brasil, contudo, a grande maioria dos trabalhos aborda, principalmente, os aspectos relacionados ao conhecimento das características ecofisiológicas e bioecológicas das espécies cultivadas, como, por exemplo Yoneshigue Braga (1971), Teixeira & Vieira (1976), Vieira (1977), Oliveira & Koenig (1984), Yamashita & Magalhães (1984), Teixeira *et al.* (1986), Koenig *et al.* (1990a, 1990b), Melo *et al.* (1993) e Lourenço *et al.* (1997), representando uma contribuição precisa sobre as características bioquímicas dessas algas, além de constituírem como bons subsídios para as atividades de cultivo em massa de microalgas, pois contêm valiosas informações sobre a eficiência dos principais meios de cultivo, principalmente os alternativos, e sobre o efeito das variáveis que interferem no crescimento das espécies cultivadas.

Os estudos sobre a composição química das microalgas ainda são recentes, limitando-se a estudos de meios de cultivo alternativos (Koenig *et al.*, 1990a, 1988; Melo *et al.*, 1993) ou comparações na composição química em relação ao meio nutritivo (Koenig, 1990b, Lourenço *et al.*, 1998).

Considerando-se o substancial crescimento das atividades de aquicultura no Brasil (em torno de 8 % ao ano, segundo Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001), se faz necessário a intensificação de pesquisas sobre o valor nutricional das microalgas, como uma forma de incentivar e valorizar esta atividade no país.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi determinar a composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Eimann & Lewin, *Isochrysis galbana* Parke, *Tetraselmis gracilis* (Kylin) e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle em cultivos unialgais.

1.2 Objetivos Específicos

- ♦ Quantificar os carboidratos solúveis, proteína solúvel, macro e microminerais presentes nas espécies acima mencionadas.
- ♦ Estimar a densidade celular nos cultivos.
- ♦ Estimar a biomassa das espécies cultivadas.
- ♦ Comparar as variações na constituição química das microalgas em diferentes tipos de cultivo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultivo

A clorofíceae *Chlorella* foi a primeira microalga a ser isolada em uma cultura pura, tendo sido Warburg (1919) o primeiro a utilizar indivíduos deste gênero para o estudo do processo fotossintético: as células cresceram em um meio de cultivo para hidroponia de vegetais superiores. Mas, somente a partir de 1940, o cultivo em massa chamou a atenção para pesquisas de diversas espécies de microalgas, como o realizado por Spoehr & Milner (1949), onde os autores estudaram a variação do conteúdo químico de *Chlorella* e de algumas diatomáceas, em relação às condições do ambiente.

- Para a obtenção de biomassa ou outras fontes de constituintes (lipídeos, por exemplo), o cultivo em larga escala de microalgas começou na Alemanha durante a Segunda Guerra Mundial (Burlew, 1953; Cook, 1954).

Um grande impulso no cultivo em massa ocorreu entre 1955 e 1975, devido à construção de pequenos laboratórios que, posteriormente, foram substituídos por sistemas de cultivo em larga escala. Os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* foram os primeiros a ser investigados, pois são de fácil cultivo (Hundley & Ing, 1956; Pippes & Gotaas, 1960; Dam *et al.*, 1965; Davis *et al.*, 1975, Ganowski *et al.*, 1975).

O desenvolvimento de técnicas de cultivo em condições controladas, tornou-se um fator decisivo para as mais variadas possibilidades

econômicas, visando, principalmente, o potencial nutritivo das microalgas como fonte de proteínas para alimentação humana (Furst, 1978; Fox, 1987); ao mesmo tempo, forneceu subsídios para a elaboração de trabalhos relacionados aos aspectos taxonômicos, fisiológicos, desenvolvimento de meios de culturas eficientes para a manutenção das culturas em laboratório (Hintz *et al.*, 1966; Guillard, 1975, 1988; Renaud *et al.*, 1999), no tratamento de esgotos (Pippes & Gotaas, 1960; Dustan & Menzel, 1971), na produção de beta-caroteno, na conversão de esgotos domésticos ou efluentes bioindustriais em biomassa de microalgas de importância econômica e na obtenção de substâncias antibióticas (Cardillo *et al.*, 1981; Accorinti, 1983; Grima *et al.*, 1999b).

2.2 Composição química

A descoberta do alto valor nutricional das microalgas, ricas em proteínas de alto valor nutritivo, lipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados e carboidratos, bem como em vitaminas hidro e lipossolúveis, além de outras moléculas úteis como carotenóides, clorofilas, enzimas, etc., fizeram com que o seu principal uso, fosse dirigido à obtenção de alimentos para organismos marinhos cultiváveis (Ukeless, 1976).

Chu *et al.* (1982) determinaram e quantificaram os polissacarídeos de cinco microalgas usadas como fonte de alimento para ostra (*Crassostrea virginica*), concluindo que estes variavam de espécie para espécie, havendo aumento dos teores de carboidrato com o tempo do cultivo devido à

mudanças na produção dos compostos estocados, sendo a glucose o principal produto armazenado.

Segundo Hirata *et al.* (1985), o conhecimento da composição química dos alimentos vivos é importante para a avaliação de seu valor nutricional.

De acordo com Fabregas *et al.* (1985a), a variação da concentração do meio de cultura induz a uma variação na composição química das microalgas. Em experimento realizado com a espécie *Tetraselmis suecica*, os autores observaram que o crescimento em massa desta espécie foi influenciado pela variação da concentração do meio nutritivo, apresentando diferenças na constituição das proteínas em 215 %, da clorofila *a* em 190 % e do conteúdo de RNA em 203 % na fase estacionária da curva de crescimento.

Fabregas *et al.* (1985b) determinaram a variação da taxa de crescimento, e os teores de clorofila *a* e proteína de *Isochrysis galbana* em diferentes salinidades e em altas concentrações de nutrientes. Os autores concluíram que a taxa máxima de crescimento de *I. galbana* foi registrada em salinidades de 15 a 35 ‰, que os teores de proteína por célula estão diretamente relacionados aos teores de salinidade e a concentração dos nutrientes e observaram ainda que, no meio nutritivo, valores superiores a 16 mM de NaNO₃, levaram a uma menor produção de clorofila *a* e proteína em todos os teores de salinidade analisados.

Ao analisar a variação da biomassa e da composição química de *Dunaliella tertiolecta* em relação à variação da concentração do meio nutritivo (4, 8 e 16 mM de NaNO₃), Fabregas *et al.* (1986) observaram que a densidade celular foi maior ($14,23 \times 10^6$ cel mL⁻¹) na concentração de 16 mM

de NaNO_3 e concluíram que, em altas concentrações nutritivas, os teores de proteína, clorofila *a*, carboidratos e RNA foram proporcionalmente maiores, 197 %, 255 %, 142 % e 150 %, respectivamente.

Segundo Whyte (1987), os nutrientes necessários para o desenvolvimento de culturas de moluscos bivalves (carboidrato, lipídeos e proteínas) provêm de microalgas do fitoplâncton, e a composição química destas influi diretamente no desenvolvimento do cultivo desses moluscos. O autor determinou a composição química de *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp. e *Isocrhysis* sp. usadas na maricultura, e verificaram que os lipídeos predominaram (5,85 - 23,54 % da matéria seca), seguidos pelos carboidratos (0,28 - 13,73 % da matéria seca).

Brown (1991), determinando os teores de aminoácidos e açúcares em dezesseis espécies de microalgas utilizadas como alimento para ostras, observaram que os níveis dos aminoácidos foram maiores nas microalgas do que nas ostras, sendo o aspartato e o glutamato encontrados nas maiores concentrações (7,6 - 12,4 % da matéria seca). Em relação aos carboidratos, estes variaram entre 91 e 96 % da matéria seca, sendo a glucose o principal açúcar. Foram ainda detectados fucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose em diferentes proporções.

O'Connor *et al.* (1992) estudaram a influência de uma dieta a base de microalgas vivas na alimentação da ostra *Saccostrea commercialis*. Os autores observaram que os maiores valores da ostra, em peso fresco, foram obtidos quando a dieta era composta por uma mistura de microalgas vivas.

Sukenik *et al.* (1993) determinaram a variação da composição química de *Nannochloropsis* sp. em relação a intensidade luminosa e a temperatura. A percentagem de longas cadeias de ácidos graxos polinsaturados, do ácido eicosapentaenóico e da biomassa variaram entre 1,6 e 3,8 % (matéria seca). Foi observado também que no menor nível de irradiação utilizado (35 quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), as células apresentaram altos valores de clorofila α , o teor de proteína ficou inalterado, enquanto que, os teores de carboidrato e lipídeos foram maiores no maior nível de irradiação utilizado (290 quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os autores concluíram que as variações na composição dos ácidos graxos e da biomassa são atribuídas às diferenças sazonais das condições climáticas (fotoperíodo e temperatura).

Segundo Lourenço *et al.* (1997), a composição química das algas pode variar de acordo com as condições do ambiente e a idade da cultura. O efeito da variação destes parâmetros vêm sendo estudados para se entender melhor a fisiologia e responder a questões específicas para otimizar o cultivo em massa das microalgas.

Brown *et al.* (1997), determinaram a composição química de 40 espécies de microalgas cultivadas na Austrália (Tabela 1), discutindo o seu valor nutricional. O teor de proteína variou de 6 a 52 %, carboidrato de 5 a 23 % e lipídeos de 7 a 23 %. Os autores concluíram que o tipo de meio de cultivo, o tempo de iluminação e a fase de crescimento da cultura analisada, contribuem para a variação na composição química das microalgas e sugerem uma mistura de microalgas para “balancear” a alimentação dos organismos consumidores.

Brown *et al.*, (1998) determinaram o valor nutricional de *Pavlova pinguis*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis* sp. utilizadas na alimentação da ostra *Crassostrea gigas* na Austrália. Os autores concluíram que a utilização de uma dieta composta pela mistura das microalgas vivas produziu os melhores resultados de crescimento nesta espécie de ostra. Foram ainda determinados os teores de proteína (17 – 48 % da matéria seca), carboidrato (22 – 41 % da matéria seca) e lipídeo (16 – 26% da matéria seca) das microalgas.

Tabela 1 - Principais espécies de microalgas cultivadas para fins econômicos.

Classe Bacillariophyceae <i>Asterionella japonica</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Chaetoceros simplex</i> <i>Ditylum brightwellii</i> <i>Navicula</i> sp <i>Nitzschia</i> sp <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Thalassiosira fluviatilis</i> Classe Prasinophyceae <i>Micromona pusilla</i> <i>Pavlova salina</i> <i>Pyraminonas grossii</i> <i>Tetraselmis chuii</i> <i>Tetraselmis gracilis</i> <i>Tetraselmis suecica</i>	Classe Haptophyceae <i>Coccolithus huxleyi</i> <i>Crisosphaera carterae</i> <i>Dicrateria inornata</i> <i>Isochrysis galbana</i> Classe Chlorophyceae <i>Brachiomonas submarina</i> <i>Chlamydomonas coccoides</i> <i>Chlorella autothrophica</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Scenedesmus</i> sp Classe Cryptophyceae <i>Chroomonas salina</i> Classe Eustigmatophyceae <i>Monodus subterraneus</i> <i>Nannochloropsis</i> sp	Classe Cyanophyceae <i>Microcystis</i> sp <i>Lyngbya</i> sp <i>Spirulina</i> sp Classe Chrysophyceae <i>Pseudopedinella</i> sp <i>Cricosphaera elongata</i> Classe Prymnesiophyceae <i>Rodella violacea</i> <i>Porphyridium cruentum</i> Classe Dinophyceae <i>Cochlodinium heterolobatum</i> <i>Crypthecodinium cohnii</i> <i>Gonyaulax catenella</i> <i>Gyrodinium cohnii</i> <i>Prorocentrum minimum</i>
--	---	--

Fonte: Ukeless (1976)

Fidalgo *et al.* (1998), determinando o efeito das fontes de nitrogênio na composição química de *Isochrysis galbana*, concluíram que a maior produção dos ácidos graxos, no final da fase exponencial de crescimento, ocorreu no meio nutritivo rico em uréia, com altos teores do ácido eicosapentaenóico (EPA - 27,66 %) e do ácido docosaheptaenóico (DHA - 14,14 %).

Southgate *et al.* (1998), determinaram a influência de uma dieta alimentar composta por *Isochrysis aff. galbana*, *Pavlova salina*, *Chaetoceros simplex*, *Tetraselmis* sp. (extrato seco) e extrato a base de leveduras para a ostra *Pinctata margaritifera*. Os autores concluíram que a dieta a base de extratos secos (*Tetraselmis* sp. + levedura) proporcionou um bom resultado na taxa de crescimento, levando a uma diminuição dos custos de produção da ostra.

Caers *et al.* (1999), realizaram um experimento para determinar o impacto da variação da dieta alimentar em ostras jovens (*Tapes philippinarum*), analisando a composição química de *Tetraselmis suecica* e de *Isochrysis galbana* em relação à taxa de crescimento e à composição dos ácidos graxos. Os autores concluíram que a composição química dos ácidos graxos no molusco variava de acordo com a espécie de microalga utilizada como alimento.

Renaud *et al.* (1999), determinaram a composição química (carboidratos, lipídeos, proteínas e cinzas) de dezoito espécies de microalgas do litoral da Austrália com possível uso em maricultura. De acordo com os dados encontrados, as diatomáceas apresentaram uma maior percentagem

de lipídeos e cinzas em relação à matéria seca e as Cryptophyceae apresentaram um maior percentual de proteínas.

Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002), compararam a produção de proteína, carboidrato, lipídeo e clorofila *a* de *I. galbana* em dois meios de cultivo: F2 e um alternativo (fertilizante). Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre os componentes químicos produzidos nos dois meios e sugerem o fertilizante em substituição do meio F2, sendo este alternativo, pelo seu baixo custo.

Os lipídeos são classificados em neutros (triacilglicerídeos, ceras, hidrocarbonos, ácidos graxos e esteróides) e polares (fosfolipídeos e glicolipídeos), sendo os neutros considerados produtos de reserva energética e os polares produtos estruturais presentes nas membranas das células (Grima *et al.*, 1999a).

Sukenik (1999), estudando a produção de EPA e DHA em espécies de *Nannochloropsis*, chamou a atenção para as diversas funções destes tipos de lipídeos, para o homem: redução do risco de mortalidade por doenças coronarianas; são essenciais ao desenvolvimento do cérebro, da retina e do sistema nervoso humano, além de serem ideais para o cultivo de rotíferos e de vários tipos de larvas de peixes.

Metzger & Largeau (1999), determinaram a composição química de *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) em laboratório, apresentando resultados da composição e da estrutura espacial dos vários tipos de lipídeos e açúcares extraídos a partir de algas já cultivadas em vários países no

mundo (Austrália, Bolívia, Estados Unidos, Filipinas, França, Índia, Inglaterra, Japão, Marrocos, Portugal, Tailândia, Venezuela, entre outros).

Estudos genéticos têm sido também realizados para otimizar a produção de EPA e DHA em *Isochrysis galbana* e *Phaeodactylum tricornutum* através de hibridização, mutação e seleção fenotípica, onde estão sendo obtidos ótimos resultados na produção desses ácidos graxos (Alonso & Del Castillo, 1999).

Poisson & Ergan (2001), compararam a produção de DHA em *I. galbana* cultivada nos meios Pravasoli 1/3 e Jones. Os autores observaram que as algas cultivadas em meio Provasoli 1/3 produziram mais DHA e que o controle da temperatura do cultivo é um importante fator para a otimização da produção do DHA pelas microalgas.

Borowitzka (1999b), ressalta a importância dos vários grupos de microalgas como organismos produtores de substâncias farmacêuticas e agroquímicas, citando as espécies e detalhando as funções antibióticas, citotóxicas, produtoras de toxinas, vitaminas, carotenóides e de ácidos graxos de cada uma das microalgas. O autor ainda chama a atenção para a importância das descobertas já realizadas e a necessidade de novos estudos, principalmente no campo médico e genético, para a otimização da produção algal em cultivo de grande escala.

Os carotenóides são pigmentos que auxiliam na absorção de luz, transferindo energia para a clorofila, agindo também como fotoprotetores. São responsáveis por 0,1 % da produção total das algas do fitoplâncton, que é de 4×10^{10} T de matéria orgânica em termos de peso seco, no ambiente

marinho. São extraídos como modelo de síntese química para “tingir” genes cancerígenos, sendo utilizados na indústria de cosméticos e farmacêutica (Liaaen-Jensen & Egeland, 1999).

Estudos sobre as ficobiliproteínas, pigmentos presentes nas cianobactérias, Rhodophyceae e na Cryptophyceae, vêm obtendo destaque mundial devido à capacidade de absorção de luz. Esses pigmentos quando conjugados a compostos biológicos específicos atuam como anticorpos além de atuarem como marcadores para imagem de microscopia eletrônica, identificadores cancerígenos, etc. (Glazer, 1999)

Segundo Borowitzka (1999 a e b), a possibilidade de produção de várias substâncias pelas algas, vem também aumentando a sua importância econômica ao longo da história, devido ao desenvolvimento e domínio de técnicas de cultivo. Vários países como Estados Unidos, Japão, China, Austrália, entre outros, já dominam a técnica de produção em larga escala das microalgas, para a extração de diferentes substâncias, obtendo-se lucros consideráveis de acordo com as tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Aplicação comercial dos produtos extraídos de microalgas cultivadas.

Alimento	Complemento alimentar protéico para humanos.
Ração	Complexo protéico e vitaminado para animais.
Terapêutico	Fonte de β -caroteno como prevenção de câncer de pele; antibióticos e enzimas hidrolíticas, promovendo a cicatrização da pele; estimulação de prostaglandina pelo ácido γ -linolênico; regulação da síntese do colesterol.
Pigmentos	β -caroteno como corante de alimentos; xantofilas em rações de peixes e aves; ficobilinas como corante de alimentos, cosméticos e reagente analítico em diagnósticos.
Fonte de substâncias químicas finas	Glicerol usado em alimentos, cosméticos e substâncias farmacêuticas; ácidos graxos, lipídeos, ceras, esteróis, hidrocarbonos, aminoácidos, enzimas, vitaminas C e E; polissacarídeos em borrachas.
Combustíveis	Longas cadeias de hidrocarbonetos e lipídeos esterificados como óleo combustível; hidrogênio; biogás.
Hormônios	Auxinas, giberelinas e citocinas.
Outros	Biofertilizantes; condicionadores de solo, tratamento de esgotos.

Fonte: Borowitzka (1999a)

Tabela 3 – Valor de venda, quantidade comercializada, valor de mercado e fontes alternativas aos produtos de algas.

Produto	Preço aproximado (\$ kg ⁻¹)*	Quantidade comercializada (t ano ⁻¹)	Valor de mercado (\$ ×10 ⁶)*	Outras fontes	Número de produtores
Biomassa rica em proteína	0,13-1			Grãos, peixes, carnes	Muitos
Glicerol	1-2			Gorduras	Muitos
Vitamina E	68	2500	170	Amendoim	Razoável
Ficocianina	<500	?	5	Nenhuma	Razoável
β - caroteno	>800	>100	8-180	Sintético, extrato de cenoura, óleo de palma	Poucos
Astaxantina	3000	50-100	30-60	Sintético; <i>Phaffia</i>	Poucos
Cantaxantina	2000	?	>100	Sintético	Poucos

Nota: *Valores em dólar americano

Fonte: Borowitzka (1999b)

Tabela 4 – Valor estimado da biomassa, baseado nos valores de produtos e conteúdo celular.

Alga	Produto	Conteúdo celular (% de M. S.)	Valor (\$ kg ⁻¹)*	Valor da alga (\$ kg ⁻¹)*
<i>Chlorella</i>	Alimento	100	25	25.00
<i>Dunaliella salina</i>	Glicerol	40	2	0.80
	β - caroteno	5	600	30.00
<i>Haematococcus pluviialis</i>	Astaxantina	2	6000	60.00
<i>Spirulina platensis</i>	Ficianina	2	500	10.00

Nota: *Valores em dólar americano

Fonte: Borowitzka (1999a)

No Brasil, o início do cultivo de microalgas ocorreu no Rio de Janeiro, com Yoneshigue-Braga (1971), cultivando *Chlamydomonas* sp., utilizando como meio de cultura água do mar enriquecida e extrato de húmus.

Vários outros trabalhos tiveram a finalidade de produzir conhecimentos técnicos que permitissem estabelecer culturas de organismos vivos, estudar fatores básicos de inter-relações de vários parâmetros que afetam o crescimento e as respostas fisiológicas da intensidade de iluminação e temperatura, como também fornecer dados que possam ser empregados em estudos posteriores (Vieira, 1975). No mesmo ano, Yoneshigue-Braga & Gonzales-Rodriguez (1975), utilizaram água de uma zona de ressurgência de Cabo Frio como meio básico para o cultivo de *I. galbana* Parke no período de fracas ressurgências. Já Teixeira & Vieira (1976), utilizaram água enriquecida coletada na superfície e a 50 metros da profundidade na região de Ubatuba para o cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*.

A partir destes conhecimentos, vários trabalhos foram realizados: determinação da produtividade primária, indicadores bioquímicos ou fisiológicos das deficiências nutricionais e testes biológicos com algas em cultura (Maestrini, 1977), métodos para a obtenção e purificação de culturas (Vieira, 1977), bioensaios visando o mecanismo de alimentação do zooplâncton e produção secundária (Vieira & Tundisi, 1978; Teixeira *et al.*, 1986), comparação de diversos extratos para cultivo (Castro, 1979; Gonzalez-Rodriguez & Maestrini, 1983, Triani *et al.*, 1984, 1986; Oliveira, 1988) e composição bioquímica (Talamoni *et al.*, 1988), onde os autores

determinaram a composição primária dos polissacarídeos em *Microcystis aeruginosa*.

Lourenço *et al.* (1997), determinaram a composição química de *Tetraselmis gracilis* em dois meios de cultivos (meio comercial e meio Conway). Segundo os autores, a concentração de proteína, por cultivo, foi maior no meio Conway, enquanto que, meio comercial, foram maiores os teores de carboidrato, lipídeos, clorofila *a* e carotenóides.

No nordeste do Brasil, o cultivo de microalgas foi iniciado no Rio Grande do Norte, para atender as necessidades dos projetos de aquicultura implantados naquele Estado, tendo sido realizados cultivos em massa, como subsídios para a alimentação de peixes e crustáceos cultivados em viveiros estuarinos. Vários trabalhos realizados em Fortaleza, Paraíba e Pernambuco foram publicados relacionados à produção em massa das microalgas, na descoberta de meios de cultivo para baratear os custos de produção (Oliveira, 1982).

Oliveira & Koenig (1984), desenvolveram estudos sobre a utilização de fertilizantes orgânicos (esterco de gado e/ou caldo de peixe), como meio de cultura para *Tetraselmis chuii*, onde a calda de peixe favoreceu melhor ao desenvolvimento celular, atingindo 403×10^6 cel L⁻¹

Koenig *et al.* (1988), realizaram experimentos preliminares sobre a viabilidade do vinhoto (calda mineralizada e não mineralizada) como fonte de nutrientes para o cultivo de *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis chuii*. Os autores observaram que a adição diária de calda mineralizada proporcionou

os melhores resultados para a densidade celular ($1,8 \times 10^8$ cel L⁻¹) e para a clorofila *a* (206,43 mg m⁻³) para *D. tertiolecta*.

Koenig *et al.* (1990a), utilizando diferentes adições de extrato de galinha para o cultivo de *T. chuii* e *T. tetrathele*, observaram que *T. Tetrathele* alcançou a maior densidade celular média ($1,3 \times 10^9$ cel L⁻¹), enquanto que *T. chuii* alcançou $9,3 \times 10^8$ cel L⁻¹ e que, o teor de clorofila *a* foi maior para *T. chuii* (1.003,88 mg m⁻³) no cultivo com 30 mL do extrato de galinha, e para *T. tetrathele* (2.014,16 mg m⁻³) no cultivo com 40 mL do extrato de galinha.

Melo *et al.* (1993), determinaram o crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* em água do mar enriquecida com soluções derivadas da decomposição de algas arribadas como meio de cultura e observaram que os melhores resultados foram obtidos com a água do mar enriquecida com extrato de *Gracilaria cf. ferox*, onde o teor máximo de clorofila *a* foi de $1,5 \times 10^{-1}$ pg cel⁻¹ e a densidade celular máxima foi de aproximadamente 8×10^6 cel mL⁻¹.

Em relação a estudos ecofisiológicos e bioecológicos, Sassi & Moura (1988), apresentaram dados preliminares sobre o efeito da concentração dos nutrientes no crescimento do fitoplâncton no litoral do nordeste do Brasil.

Em relação à composição química das microalgas cultivadas no Nordeste, pode-se citar somente o trabalho de Koenig *et al.* (1990b). Esses autores determinaram a composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* cultivada com fertilizante orgânico, e constataram que nessa condição de cultivo a densidade celular máxima atingiu $608,75 \times 10^3$ cel mL⁻¹, o teor de

proteína foi de 310 $\mu\text{g L}^{-1}$, o de carboidrato foi de 209,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o de lipídeo foi de 28,50 μg .

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORINTI, J. Antifungal product from algal origin (review). **Revue. Intern. Oceanogr.**, v. 72, p. 45 - 53, 1983.

ALONSO, D. L.; DEL CASTILLO, C. I. S. Genetic improvement of EPA content in microalgae. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 5, p. 93 - 107, 1999.

ANTIA, N. J.; BERLAND, B. R.; BONIN, D. J.; MAESTRINI, S. E. Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. **Phycologia**, v. 16, n. 1, p. 105 - 111, 1977.

ARAD, S. Polysaccharides of red microalgae. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 12, p. 282 - 291, 1999.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 293 p., 1995.

BEM-AMOTZ, A. Production of β -carotene from *Dunaliella*. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 9, p. 196 - 204, 1999.

BOROWITZKA, M. A., Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (ed.) **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, cap 7, p.153 - 196, 1988.

BOROWITZKA, M. A. Economic evaluation of microalgal process and products. In: ZVI, C. (ed). **Chemicals from microalgae**. UK: Taylor & Francis. cap.16, p. 387 - 409, 1999a.

BOROWITZKA, M. A. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 14, p. 313 - 351, 1999b.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. *Dunaliella*. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (ed.) **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, cap 2, p.27 - 58, 1988.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **J. Exp. Biol. Ecol.** v 145, p. 79-99, 1991.

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

BROWN, M. R.; MCMCAUSLAND, M. A.; KOWALSKI, K. The nutritional value of four Australian microalgal starins fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. **Aquaculture**, v. 165, p. 281 – 293, 1998.

BURLEW, J. S. **Algal culture from laboratory to pilot plant**. Washington D.C.: Carnegie Institution, Pub. n. 600, 1953.

CAERS, M.; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. **Aquaculture**, v. 179, p. 307 - 322, 1999.

CARDILLO, G.; ORENA, M.; PORZI, G.; SANDRI, S. - Synthesis of malyngolide, an antibiotic from the marine blue-green algae *Lyngbya majuscula*. **Journal of organic chemistry**, v. 46, p. 2439 - 2442, 1981.

CASTRO, A. R. C. **Utilização de adubo orgânico em cultura de fitoplâncton**. Rio de Janeiro, PESAGRO, 2 p., 1979 (comunicado Técnico, 37).

CHU, F. L. E.; DUPUY, J. L.; WEBB, K. L. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. **Aquaculture**, v. 29, n. 3/4, p. 241 - 252, 1982.

COOK, P. M. Chemical engineering problems in large-scale culture of algae. **Engr. Proc. Develop.**, v. 43, p. 2385 – 2389, 1954.

COHEN, Z. *Prophyridium cruentum*. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 1, p. 1 – 24, 1999.

DAM, R.; LEE, S.; FRY, P.; FOX, H. Utilization of algae as a protein source for humans. **Journal of nutrition**, v. 86, p. 376 – 382, 1965.

DAVIS, I. F.; SHARKEY, M. J.; WILLIAMS, D. Utilization of sewage algae in association with paper in diets of sheep. **Agriculture and environment**, v. 2, p. 333 – 338, 1975.

DE PAUWN, N.; PERSOONE, G. Micro-algae for aquaculture. In: Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J. (Ed.) **Micro-algal biotechnology**. Sydney: Cambridge University Press. cap. 08, 477 p., 1988.

DUNSTAN, W. M.; MENZEL, D. W. Continuous cultures of natural populations of phytoplankton in dilute, treated sewage effluent. **Limnology and oceanography**, v. 16, p. 623 - 632, 1971.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; ABALDE, J.; CABEZAS, B. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. **Aquaculture**, v. 50, p. 1-11, 1985b.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; ABALDE, J. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch with high nutrients concentrations. **Aquaculture**, v. 49, p. 231-244, 1985a.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; ABALDE, J. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. **Aquaculture**, v. 53, p. 101 - 113, 1986.

FIDALGO J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*, **Aquaculture**, v. 166, p. 105 - 116, 1998.

FOX, R. D. *Spirulina*, real aid to development. **Hydrobiologia**, v. 151/152, p. 95 - 95, 1987.

FURST, P. T. *Spirulina*, a nutritious alga, once a staple of Aztec diets, could feed many of the world's hungry people. **Hum Nat.**, Março, 1978, p. 60 - 65, 1978.

GANOWSKI, H.; USUNOVA, K.; KARABASHEV, G. Effect of the microalga *Scenedesmus acutus* on the digestibility of the mast of calves and on some blood parameters. **Animal science**, v. 12, p. 74 - 83, 1975.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 11, p. 261 - 280, 1999.

GOLDMAN J. C. Physiological aspects in algal mass cultures, in: SHELEF G., SOEDER C. J. (Ed.), **Algae Biomass**, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980, pp. 343 - 359.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E.; MAESTRINI, S. Y. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. **Aquaculture**, v. 36, p. 245 - 256, 1983.

GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G.; FERNÁNDEZ, F. G. A. Production of EPA from *Phaeodactylum tricornutum*. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 4, p. 57 - 92, 1999a.

GRIMA, E. M.; MEDINA, A. R.; GIMÉNEZ, A. G. Recovery of algal PUFAs. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 6, p. 108 - 144, 1999b.

GUILLARD, R. R. L. Cultures of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H., Ed., **Culture of marine invertebrates animals**, Plenum Publish. Co., New York, p. 29 - 60, 1975.

GUILLARD, R. R. L. The center for culture of marine phytoplankton: History, structure, function and future. **Journal protozoology**, v. 35, p. 255 - 256, 1988.

GUILLARD, R. R. L.; WANGERSKY, P. J. The production of extracellular carbohydrates by some flagellates. **Lymnology and oceanography**, v. 3, p. 449 - 454, 1958.

HIRATA, H.; MAVRIKOS, A.; SHICEHISA, Y. Evaluation of use of *Brachionus plicatilis* and *Artemia nauplii* for rearing prawn *Penaeus japonicus* larvae on a laboratory scale. **Mem. Fac. Fish. Kagoshima University**, v. 34, n. 01, p. 27-36, 1985.

HINTZ, H. F.; HEITMAN JR, H.; WIER, W. C.; TORELL, P. T.; MEYER, J. H. Nutritive value of algae grown on sewage. **Animal science**, v. 25, p. 675, 1966.

HUNDLEY, J. M.; ING, R. B. Algae as source of lysine and threonine in supplementing wheat and bread diets. **Science**, v. 124, p. 536 - 537, 1956.

KOENING, M. L.; LACERDA, S. R.; PASSAVANTE, J. Z. O. Cultivo em laboratório de *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis tetrathele* (Chlorophyceae) com fertilizantes orgânicos. **Arq. Biolog. Tecnol.**, v. 33, n. 1, p. 91 - 103, 1990a.

KOENING, M. L.; MAIA, P. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. **Revista biológica brasileira**, v. 2, n. 1, p. 23 - 38, 1990b.

KOENING, M. L.; PASSAVANTE, J. Z. O.; BARTOLOMEU, C. C.; COSTA, K. M. P. O vinhoto no cultivo de microalgas. **Gayana**, v. 45, n. 1-4, p. 253 - 263, 1988.

LIAAEN-JENSEN, S.; EGELAND, E. S. Microalgal carotenoids. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 7, p. 145 - 172, 1999.

LOPES-MUÑOZ, I.; ABALDE, J.; HERERRO, C. Crescimento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com diferentes temperaturas e intensidades de luz. **Nova acta científica compostelana**, v. 3, 59 - 65, 1992.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U. M. L.; MANCINI-FILHO, J.; AIDAR, E., BARBARINO E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of phycology**, v. 34, p. 798 - 811, 1998.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U. M. L.; MANCINI-FILHO, J.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, p. 153 - 158, 1997.

MAESTRINI, S. Y. **A utilização dos indicadores fisiológicos e dos testes biológicos para a determinação dos fatores nutricionais que limitam a produção do fitoplâncton**. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas da Marinha, 1977. 24 p. (Publicação, 110).

MELO, G. N.; SASSI, R.; ARAÚJO, T.F.H. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN (Bacillariophyta) em água do mar enriquecida com soluções derivadas a decomposição de algas arribadas com meio de cultura. **Revista nordestina de biologia**, v. 8, n. 1, p. 45 - 53, 1993.

METZGER, P.; LARGEAU, C. Chemicals of *Brotyococcus braunii*. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 10, p. 205 - 260, 1999.

NELSON J. R., GUARDA S., COWELL L.E., HEFFERNAN P.B. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30°C, **Aquaculture**, v. 106, p. 357 - 377, 1992.

O'CONNOR, W. A.; NELL, J. A.; DIEMAR, J. A. The evaluation of twelve algal species as food for juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). **Aquaculture**, v. 108, p. 277 - 283, 1992.

OLIVEIRA, D. B. F. Produção em massa de microalgas na dieta do camarão larval. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, 1. **Anais ...** Natal, 1982, p. 327 - 329.

OLIVEIRA, A. A. G.; KOENING, M. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. **Arg. Biol. Tecnol.**, v. 27, n. 3, p. 293 - 298. 1984.

OLIVEIRA, H. T. Utilização da vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP - 211/11 b). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PLÂNCTON, 3. **Resumos...** Pontal do Sul, 1988, p. 28.

PIPES, W. O.; GOTAAS, H. B. Utilization of organic matter by *Chlorella* growth in sewage. **Applied microbiology**, v. 8, p. 163 - 169, 1960.

POISSON, I.; ERGAN, F. Docosaheptaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. **Journal of biotechnology**, v. 91, p. 75 - 81, 2001.

RENAUD, S. M.; THINH, L.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**, v. 170, p. 147 - 159, 1999.

SASSI, R.; MOURA, G. F. Nutrient limiting phytoplankton growth from coastal reefs of northeastern Brazil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PLÂNCTON 3. **Memórias...** Caiobá, p. 57 - 62, 1988.

SAUODI-HELIS, L.; DUBACQ, J. P.; MARTY, Y. SAMAIN, J. F. GUDIN C. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T. **Journal applied to phycology**, v. 6, p. 315 - 322, 1999.

SHELEF, G.; SOEDER, C. G. **Algae biomass. Products and use.** North Hollan: Elsevier, 852 p., 1980.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** São Carlos: RiMa, 2001, 106 p.

SOUTHGATE, P. C.; BEER, A. C.; DUNCAN, P. F.; TAMBURRI, R. Assessment of nutritional value of three species of tropical microalgae, dried *Tetraselmis* and a yeast-based diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). **Aquaculture**, v. 162, p. 247 - 257, 1998.

SPOEHR, H. A.; MILNER, H. W. The chemical composition of *Chlorella*. Effect of environmental conditions. **Plant physiology**, v. 24, p. 120 - 149, 1949.

SUKENIK, A.; YAMAGUCHI, Y.; LIVNE, A. Alteration in lipid molecular species of the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp., **Journal of phycology**, v. 29, p. 620 - 626, 1993.

SUKENIK, A. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 3, p. 41 - 56, 1999.

TALAMONI, J. L. B.; SILVA, F. H.; CACERES, O. Composição primária dos polissacarídeos de *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin (Cyanophyceae). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PLÂNCTON, 3. **Resumos...** Pontal do Sul, 1988, p. 31.

TEIXEIRA, C.; VIEIRA, A. A. H. Nutrient experiments using *Phaeodactylum tricornutum* as an assay organism. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 29 - 42, 1976.

TEIXEIRA, C.; KUTNER, M. B. B.; AIDAR-ARAGÃO, E.; SCHIMIDT, G. Algal assay of limiting nutrients for phytoplankton production and growth of Flamengo bay (Ubatuba - Brasil). **Revista brasileira de biologia**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 491 - 506, 1986.

TOMAS, R. C. **Identifying marine phytoplankton**. New York: Academic Press. 858 p., 1997.

TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; COSTA, R. A. **Extrato de lixo residencial como fonte de nutrientes para o cultivo de *Skeletonema costatum* Grev. (Cleve)**. Rio de Janeiro, PESAGRO, 3 p., 1984.

TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; RODRIGUES, P. C. **Extrato de lixo urbano para culturas externas em larga escala de *Tetraselmis chuii* Butcher**. Rio de Janeiro, PESAGRO, 5 p., 1986 (Comunicado Técnico, 168).

UKELESS, R. A. Cultivation of plants-unicellular, 370 - 466. In: KINNE, O. (Ed), **Marine ecology**. John Wiley & Sons, 577 p., 1976.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, 207 - 216, 2002.

VIEIRA, A. A. H. **Estudos experimentais em fitoplâncton marinho. Cultura e aspectos ecofisiológicos**. São Paulo, 115 p., 1975. Dissertação - Universidade de São Paulo, 1975.

VIEIRA, A. A. H. Métodos de cultura de algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananéia e Ubatuba - SP. **Boletim do instituto oceanográfico**. São Paulo, v. 26, n. 2, p. 303 - 338, 1977.

VIEIRA, A. A. H.; TUNDISI, J. Cultivo de fitoplâncton lacustre no Departamento de ciências Biológicas da UFSCar. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUACULTURA, 1. **Resumos...** Recife, Departamento de Oceanografia, UFPE, 1978, p.71.

WARBURG, O. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. **Biochemistry**, v. 100, p. 230 – 237, 1919.

WHYTE, J. N. C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. **Aquaculture** v. 60, p. 231 - 241, 1987.

YAMASHITA C.; MAGALHÃES P. M. S. **Meios de cultura para a alga *Chaetoceros gracilis***, Boletim de Pesquisa n. 7, EMPARN, Rio Grande do Norte, 1984, 18 p.

YONESHIGUE-BRAGA, Y. **Estudo experimental em laboratório de *Chlamydomonas* sp**, Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisa da Marinha, 1971. 9 p. (Publicação 56).

YONESHIGUE-BRAGA, Y.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, E. **Estudos preliminares do crescimento de *Isochrysis galbana* Parke usando água profunda como meio básico**. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas da Marinha, 1975. 7p. (Publicação, 90).

4 TRABALHOS

4.1 Composição química de *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Eimann & Lewin e *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher cultivadas em garrafão de vidro.

A SER ENVIADO PARA A REVISTA HOEHNEA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *CHAETOCEROS GRACILIS* SCHÜTT, *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENBERG) EIMANN & LEWIN E *TETRASELMIS GRACILIS* (KYLIN) BUTCHER CULTIVADAS EM GARRAFÃO DE VIDRO

Alfredo Matos Moura Junior

Programa de Pós-Graduação em Botânica - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos, Recife – Pernambuco, Brasil.

alfmoura@cap.ufpe.br

Egídio Bezerra Neto

Departamento de Química/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Maria Luise Koenig

Departamento de Oceanografia/Universidade Federal de Pernambuco

Enide Eskinazi Leça

Programa de Pós-Graduação de Botânica/Universidade Federal Rural de Pernambuco

¹- Parte da tese de Doutorado realizado no Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Resumo

Este trabalho objetivou a determinação da composição química de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, espécies de freqüente uso na aquicultura no Nordeste do Brasil. As espécies foram cultivadas em meio f/2-Guillard, em garrafão de vidro, aeradas a partir de um litro, com iluminação constante e as análises foram realizadas no final da fase exponencial. *C. gracilis* apresentou maior densidade celular, chegando a 8.447×10^6 cel L⁻¹, o maior valor para carboidratos solúveis ($0,10 \pm 0,009$ mg L⁻¹) e magnésio ($14,78 \pm 0,08$ mg L⁻¹). *C. closterium* apresentou a maior concentração para clorofila *a* ($13,76 \pm 1,11$ mg L⁻¹), proteína solúvel ($0,62 \pm 0,04$ mg L⁻¹), aminoácidos totais livres ($23,82 \pm 0,84$ mg L⁻¹), nitrato ($0,365 \pm 0,025$ mg L⁻¹), sódio ($0,46 \pm 0,047$ mg L⁻¹) e fósforo ($2,80 \pm 0,38$ mg L⁻¹). Os teores de potássio ($0,02$ mg L⁻¹) e enxofre ($0,03$ mg L⁻¹) foram iguais para *C. gracilis* e *C. closterium*. A espécie *T. gracilis* apresentou os menores valores nas variáveis analisadas e como verificado, há uma variação na composição química entre as espécies analisadas.

Palavras Chaves: *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Tetraselmis gracilis*, composição química

Abstract

The purpose of this study was to determine the chemical composition of *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* and *Tetraselmis gracilis*, species frequently utilized as food source for aquaculture in the northeast of Brazil. The species were grown in f/2 medium, in carboys, aerated from one liter, with constant illumination and analyses were made in late exponential phase. *C. gracilis* showed highest cellular density ($8,447 \times 10^6$ cel L⁻¹), soluble carbohydrate (0.10 ± 0.009 mg L⁻¹) e magnesium (14.78 ± 0.08 mg L⁻¹). *C. closterium* showed highest amounts to chlorophyll *a* (13.76 ± 1.11 mg L⁻¹), soluble protein (0.62 ± 0.04 mg L⁻¹), total aminoacid (23.82 ± 0.84 mg L⁻¹), nitrate (0.365 ± 0.025 mg L⁻¹), sodium (0.46 ± 0.047 mg L⁻¹) e phosphorus (2.80 ± 0.38 mg L⁻¹). Both species showed values to potassium (0.02 mg L⁻¹) and sulfur (0.03 mg L⁻¹). *T. gracilis* showed the lowest values in all variables analyzed.

Key words: *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Tetraselmis gracilis*, chemical composition

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da aquicultura no mundo e a necessidade de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais nos cultivos, as pesquisas têm revelado a importância da produção de alimento para o desenvolvimento das espécies cultivadas. O conhecimento sobre a alimentação natural, e os hábitos de seleção alimentar desses organismos são essenciais para uma alta produtividade, pois esta depende da conversão do alimento em diferentes níveis tróficos, determinando um máximo de bioprodutividade (Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001). A importância da obtenção de culturas unialgais está na grande variedade com que as mesmas podem e devem ser usadas com finalidades mais diversas como genética, citologia, taxinomia e fisiologia vegetal (Sukenik & Whanon, 1991, Fidalgo *et al.*, 1998, Renaud *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm sido realizados para determinar a composição química das microalgas com o objetivo de produzir alimento direcionado às necessidades nutricionais de espécies animais criados em cativeiro (Whyte 1987, Brown *et al.* 1997, 1998; Southgate *et al.*, 1998, Caers *et al.*, 1999), e também, relacionadas à variação da constituição química das microalgas em relação ao meio nutritivo no qual estão sendo

cultivadas (Antia *et al.*, 1977, Fabregas *et al.*, 1985a e b, 1986, Melo *et al.*, 1993, Lourenço *et al.*, 1997).

No Brasil, os estudos sobre a composição química das microalgas ainda são recentes, limitando-se a estudos de meios de cultivo alternativos (Koenig *et al.*, 1990a, 1998; Melo *et al.*, 1993) ou comparações na composição química em relação ao meio nutritivo (Koenig, 1990b, Lourenço *et al.*, 1998).

Considerando-se o substancial crescimento das atividades de aquicultura no Brasil (cerca de 8 % ao ano, segundo Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001), se faz necessário à intensificação de pesquisas sobre o valor nutricional das microalgas, como uma forma de incentivar e valorizar esta atividade. Este trabalho teve como objetivo determinar a composição química das espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, largamente utilizadas em ensaios e cultivos de peixe e camarão na região nordeste do Brasil, com a finalidade de fornecer dados para orientação aos aquicultores.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis* foram cultivadas em triplicata, no Laboratório de Cultivo do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, em garrações de vidro transparentes de 8 litros de capacidade, em meio f/2 – Guillard (Guillard, 1975) com aeração, em condições de iluminação constante (duas lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, de 20W cada uma) e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Os experimentos partiram de amostras que vinham sendo mantidas em tubos de 10 mL, nas mesmas condições de iluminação e temperatura, e no mesmo meio de cultura, e que se encontravam na fase exponencial de crescimento. As espécies foram inoculadas em frascos de 250 mL contendo meio f/2 e a cada 8 dias este volume era duplicado com água do mar autoclavada (1 atm por 1h), enriquecida com os mesmos componentes do meio f/2, até que o total de 8 litros de cultivo fosse atingido. Após um período de oito dias nesta condição, os experimentos foram interrompidos, procedendo-se à realização das análises químicas do cultivo e a determinação das densidades celulares e das concentrações de clorofila *a*.

As contagens celulares foram efetuadas diariamente, para a determinação das curvas de crescimento, e no final do ciclo de cultivo, no laboratório de cultivo da Universidade Federal de Pernambuco, em microscópio binocular Zeiss, utilizando-se

câmaras de Neubauer, em amostras preservadas com formol neutro a 4%. O pH dos cultivos foi determinado diariamente pelo método colorimétrico.

Para determinação da clorofila *a*, foram utilizadas 20 mL de cada amostra, as quais foram filtradas com três repetições, em filtros Whatmann GF/F de fibra de vidro, de 47 mm de diâmetro. A extração foi efetuada com acetona a 90% e as leituras foram efetuadas num espectrofotômetro, adotando-se os procedimentos descritos em Becker (1995).

O restante do cultivo de cada garrafão foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos, recolhendo-se o material precipitado, o qual foi seco em estufa até peso constante à temperatura de 60 °C, conforme procedimento recomendado por Bezerra Neto *et al.* (1994).

Para análise de carboidratos solúveis, proteína solúvel e nitrato, pesou-se 1,0 g do material seco e preparou-se um extrato acrescentando-se 10 mL de água destilada. Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método descrito por Yemm & Wills (1954). Para tal, pipetou-se para um tubo de ensaio um volume de 200 µL do extrato, acrescentando-se em seguida 2 mL do reagente antrona para o desenvolvimento da cor, a qual ocorreu em banho quente a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm, comparando-se os resultados das leituras das amostras com os resultados das leituras de soluções padrões de glucose na faixa de concentração entre 0 e 300 mg L⁻¹.

Os teores de proteína solúvel foram determinados pelo método de Bradford (1976), recolhendo-se 100 µL do extrato de algas para um tubo de ensaio e acrescentando-se 2,0 mL do reagente “coomasie” azul brilhante (*coomassie brilliant blue*). Após o desenvolvimento da cor, procedeu-se às leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 595 nm, comparando-se os resultados com soluções padrões de albumina bovina (BSA) na faixa de concentração de 0 a 200 mg L⁻¹. Os aminoácidos totais livres foram determinados pelo método descrito por Yemm & Cocking (1955).

A análise de nitrato foi realizada pelo método descrito por Cataldo *et al.* (1975), pipetando-se 200 µL do extrato para um tubo de ensaio e acrescentando-se 800 µL do reagente ácido salicílico (a 5 % em H₂SO₄). Após 20 minutos acrescentou-se 18 mL de NaOH (2 N) e, em seguida, procedeu-se às leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 410 nm. Os resultados foram comparados com soluções padrões do nitrato na faixa de concentração de 0 a 300 mg L⁻¹.

Os elementos químicos sódio e magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, de acordo com a metodologia de Malavolta *et al.* (1989). O enxofre foi determinado por turbidimetria, segundo Sarruge & Haag (1974), o fósforo pelo método colorimétrico do molibdo-vanadato de amônio e o potássio por fotometria de chama, segundo Bezerra Neto *et al.* (1994).

No tratamento estatístico dos dados empregou-se uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de $\alpha = 0,05$, com posterior aplicação do teste de Tukey, com o auxílio do programa SANEST (Sarriés *et al.*, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Densidade celular

Chaetoceros gracilis, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis* têm sido utilizadas com sucesso como fonte alimentícia para uma variedade de moluscos e outros organismos, sendo essas microalgas mais utilizadas na maricultura (Sukeník & Wahnón, 1991).

No presente trabalho, a curva de crescimento das espécies *C. gracilis* e *T. gracilis* são apresentados na Figura 1. O pH variou de 7,5 a 10 para o cultivo de *C. gracilis* e de 7,7 a 9,5 para o cultivo de *T. gracilis*.

Em relação a densidade celular no final do ciclo de cultivo, a espécie *C. gracilis* apresentou o melhor resultado, alcançando $8.442 \pm 7,07 \times 10^6$ cel $\cdot L^{-1}$ no final do experimento enquanto que *T. gracilis*, alcançou, ao término do experimento, $562 \pm 19,45 \times 10^6$ cel $\cdot L^{-1}$, com diferença altamente significativa entre as duas espécies ($P < 0,05$) (Tabela 1). Valores semelhantes de densidade ($95 - 6.415 \times 10^6$ cel $\cdot L^{-1}$) foram obtidos por Yamashita & Magalhães (1984), cultivando *C. gracilis* em condições semelhantes, mas com meio FeNS, e por Lourenço *et al.* (1997), cultivando *T. gracilis* em meio Conway em condições similares (150×10^6 cel $\cdot L^{-1}$).

Devido ao fato de ocorrer aglutinação de células durante todo o período de cultivo, mesmo com aeração nos frascos, não foi possível fazer a contagem das células de *C. closterium*. Esta dificuldade também foi ressaltada por Brown (1991), em meio f/2.

Composição química

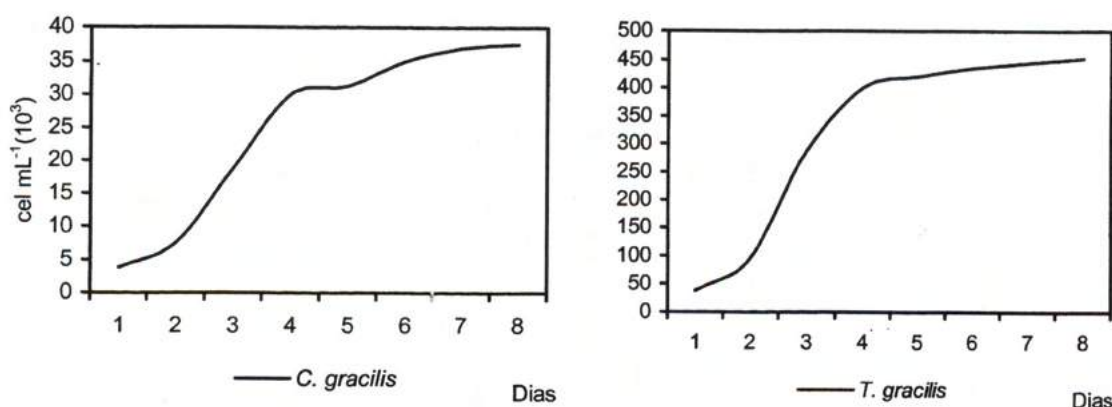


Figura 1 – Curvas de crescimento de *Chaetoceros gracilis* e *Tetraselmis gracilis* em meio de cultura f/2 Guillard.

Um dos parâmetros para monitorar o desempenho da produção dos cultivos de algas é estimar seu crescimento, geralmente expresso em aumento da biomassa, densidade, quantificação de proteínas, pigmentos, carboidratos, etc, em um certo período de tempo (Becker, 1995). Como acontece em qualquer vegetal superior, a biomassa e a composição química das algas também podem variar de acordo com as condições do ambiente e com a idade da cultura (Lourenço *et al.*, 1998), o que vem sendo estudado para otimizar o cultivo em massa das microalgas (Fidalgo *et al.*, 1998; Renaud *et al.*, 1999).

Tabela 1 – Densidade celular média ($\times 10^6$ cel L^{-1}) de *Chaetoceros gracilis* e *Tetraselmis gracilis* cultivadas em garrafão de vidro com meio f/2 – Guillard.

Espécies	Início (250 mL)	Final (8.000 mL)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	$45 \pm 1,77$	$8.442 \pm 7,07^a$
<i>Tetraselmis gracilis</i>	$480 \pm 29,17$	$562 \pm 19,45^b$

Letras diferentes nas colunas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação a clorofila *a*, a espécie *C. closterium* obteve melhor resultado médio ($13,76 \pm 1,1$ mg L^{-1}), seguida por *T. gracilis* ($7,12 \pm 0,61$ mg L^{-1}) e por *C. gracilis* ($3,28 \pm 0,82$ mg L^{-1}), havendo diferença significativa entre as três espécies ($P < 0,05$) (fig. 2A). Estes valores são superiores aos encontrados por Lourenço *et al.* (1997), cultivando *T. gracilis* em meio Conway ($1,51 - 3,57$ mg L^{-1}) e inferiores aos determinados por Brown (1991), cultivando *C. gracilis* em meio f/2 ($0,78$ pg cel⁻¹). O alto valor de clorofila *a* deveu-se provavelmente a alta densidade, o que diminui a irradiação dentro do garrafão

fazendo com que as células produzam mais clorofila (López-Muñoz *et al.*, 1992; Saoudis-Helis *et al.*, 1999, Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Em relação ao teor de carboidratos solúveis, o maior valor foi determinado em *C. gracilis* ($0,1 \pm 0,009 \text{ mg L}^{-1}$), seguida por *C. closterium* ($0,09 \pm 0,014 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. gracilis* ($0,06 \pm 0,008 \text{ mg L}^{-1}$) significativamente diferente das duas primeiras ($P < 0,05$) (Fig. 2B). Estes valores são considerados baixos para a fase de cultivo analisada (final da fase exponencial onde as espécies tendem a acumular carboidrato, como resposta a limitação do nitrogênio utilizado durante a fase Log para a síntese de proteína, diminuindo a sua quantidade (Brown, 1991, 1997; Renaud *et al.*, 1999).

Este fato também foi observado neste trabalho em relação ao teor de proteína solúvel (Fig. 2C), onde o maior valor foi determinado em *C. closterium* ($0,62 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$) seguida por *C. gracilis* ($0,58 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. gracilis* ($0,38 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$), também significativamente diferente das duas primeiras ($P < 0,05$) e aos teores de aminoácidos totais livres (Fig. 2D), com diferenças significativas entre as espécies ($P < 0,05$) (*C. closterium* – $23,28 \pm 0,84 \text{ mg L}^{-1}$; *C. gracilis* – $15,25 \pm 1,40 \text{ mg L}^{-1}$; *T. gracilis* – $1,49 \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1}$). Estes valores são menores que os determinados por Fabregas *et al.* (1985b), desenvolvendo cultivo em massa de *T. suecica*, encontraram valores máximos de proteína de $306 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ na fase logarítima de cultivo. Koenig *et al.* (1990b), onde os autores determinando a composição química de *T. tetraathele* cultivada com fertilizante orgânico, constataram que, nesta condição, o teor de proteína solúvel foi de $310 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Em relação aos teores de sais analisados, a espécie *C. closterium* apresentou os maiores valores para o nitrato ($0,365 \pm 0,025 \text{ mg L}^{-1}$) com diferença significativa das outras duas espécies ($P < 0,05$), o sódio ($0,46 \pm 0,047 \text{ mg L}^{-1}$) com diferença significativa entre as três espécies ($P < 0,05$) e o fósforo ($2,80 \pm 0,380 \text{ mg L}^{-1}$), diferente significativamente de *T. gracilis* ($P < 0,05$). Os teores de potássio ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$) e enxofre ($0,03 \text{ mg L}^{-1}$) foram iguais para *C. gracilis* e *C. closterium*. A espécie *T. gracilis* apresentou o menor teor de sais, com diferença significativa para o potássio ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Como verificado, há diferenças na composição química entre as espécies analisadas, mesmo quando cultivadas nas mesmas condições. Estas diferenças podem estar relacionadas a diferenças específicas no metabolismo das células, havendo

variação, portanto, no balanço químico de clorofila *a*, proteínas, carboidratos e sais minerais.

Estes fatores, quando associado a outros componentes químicos, como vitaminas, são essenciais para promover o crescimento dos organismos que se alimentam das microalgas (Chu *et al.*, 1982, Webb e Chu, 1983, Brown *et al.*, 1998).

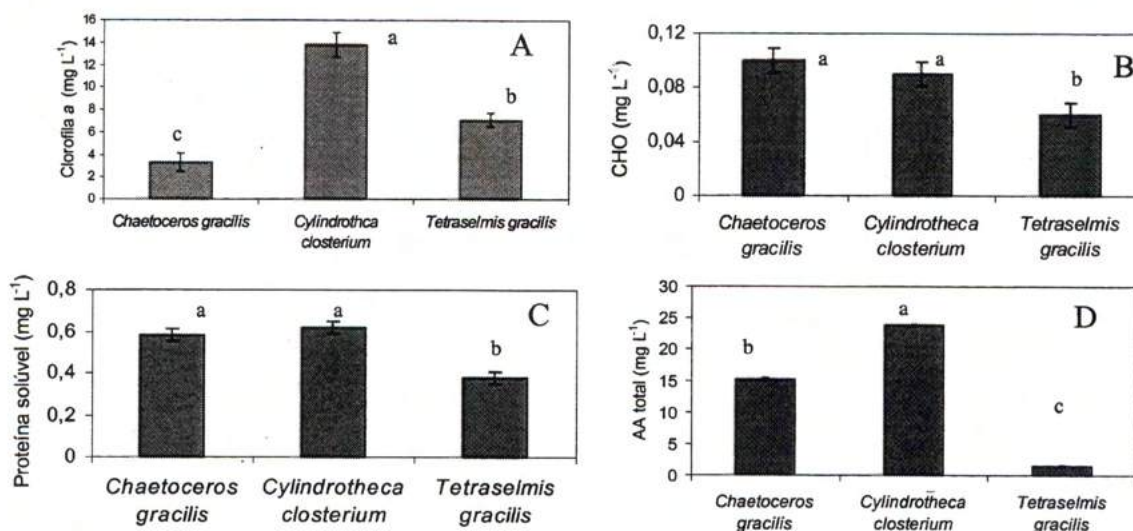


Figura 2 – Teores de clorofila *a* (A), carboidratos solúveis (B), proteína solúvel (C) e aminoácidos totais livres (D) em três espécies de microalgas cultivadas em garrafão de vidro com meio f/2 – Guillard. CHO – carboidrato solúvel; AA total – aminoácidos totais livres. Letras diferentes diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Valores médios ($\pm$ d.p.) dos teores de sais em *Chaetoceros gracilis*, *Cyndrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis* cultivadas em garrafão de vidro com meio f/2 – Guillard.

	<i>Chaetoceros gracilis</i> mg L ⁻¹	<i>Cyndrotheca closterium</i> mg L ⁻¹	<i>Tetraselmis gracilis</i> mg L ⁻¹
Nitrato	0,130 $\pm$ 0,04 ^b	0,365 $\pm$ 0,025 ^a	0,08 $\pm$ 0,010 ^b
Sódio	0,07 ^a	0,46 $\pm$ 0,047 ^b	0,03 ^c
Potássio	0,02 ^a	0,02 ^a	0,008 ^b
Fósforo	2,09 $\pm$ 0,02 ^a	2,80 $\pm$ 0,380 ^a	0,95 $\pm$ 0,160 ^b
Magnésio	14,78 $\pm$ 0,08 ^a	4,97 $\pm$ 0,060 ^a	6,95 $\pm$ 0,300 ^a
Enxofre	0,03 ^a	0,03 ^a	0,01 $\pm$ 0,005 ^a

Letras diferentes entre as linhas, as médias diferem significativamente ao nível de 5%.

CONCLUSÕES

As microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Cyndrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, quando cultivadas em meio f/2-Guillard e em garrafões de vidro apresentaram diferenças quantitativas nos compostos químicos e na biomassa. Essas variações foram

observadas no conteúdo da clorofila *a*, densidade celular, quantidade de proteína e carboidratos solúveis, aminoácidos totais livres e sais.

Cylindrotheca closterium foi a espécie que apresentou melhor rendimento, principalmente, quanto aos teores de clorofila *a*, carboidrato e proteína solúveis. A mesma espécie apresentou, também, teores de nitrato significativamente muito mais elevados.

Tetralsemis gracilis apresentou o menor rendimento, tendo produzido valores significativamente mais baixos nos compostos analisados.

Agradecimentos,

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão de dois anos de bolsa de doutorado ao primeiro autor, as Universidades Federal de Pernambuco e Federal Rural de Pernambuco, pela utilização de suas instalações.

LITERATURA CITADA

- Antia, N. J.; Berland, B. R.; Bonin, D. J. & Maestrini, S. E. 1997. Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. *Phycologia* 16(1):105 – 111.
- Becker, E. W. 1995. *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press, New York, 293 p.
- Bezerra Neto, E., Andrade A. G. & Barreto L. P. *Análise química de tecidos e produtos vegetais*, Recife, UFRPE, 1994. 99 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. 72: 248 – 254.
- Brown, M. R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture, *J. Exp. Biol. Ecol.* 145:79 – 99.
- Brown, M. R., Jeffrey S. W., Volkman J. K. & Dunstan G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture* 151: 315 – 331.
- Brown, M. R., McMausland, M. A. & Kowalski, K. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal starins fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 165: 281 – 293.

- Caers, M., Coutteau, P. & Sorgeloos, P. 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170: 307 – 322.
- Cataldo, D. A., Harron, M., Schrader, L. & Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant and tissue by nitration of salicylic acid, *Commun. Soil Science and Plant Analysis* 6: 71 – 80.
- Chu, F. L. E., Dupuy, J. L. & Webb, K. L. 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 29(3/4): 241 – 252.
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J. & Cabezas, B. 1985b. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations, *Aquaculture* 50: 1 – 11.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. 1985a. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch with high nutrients concentrations. *Aquaculture* 49: 231 – 244.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture* 53: 101 – 113.
- Fidalgo J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. & Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166: 105 – 116.
- Guillard, R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animal*, p. 29 – 60.
- Koenig, M. L., Lacerda, S. R. & Passavante, J. Z. O. 1990a. Cultivo em laboratório de *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis tetrathele* (Chlorophyceae) com fertilizantes orgânicos. *Arq. Biolog. Tecnol.* 33: 91 – 103.
- Koenig, M. L., Maia, P. R. & Campos-Takaki, G. M. 1990b. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. *Revista Biológica Brasileira* 2:23 – 38.
- Koenig, M. L., Passavante, J. Z. O., Bartolomeu, C. C. & Costa, K. M. P. 1998. O vinhoto no cultivo de microalgas. *Gayana* 45: 253 – 263.
- Lopes-Muñoz, I., Abalde, J. & Hererro, C. 1992. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta Científica Compostelana* 3:59 – 65.
- Lourenço, S. O., Marquez, U. M. L., Mancini-Filho, J., Aidar, E. & Barbarino E. 1998. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation

- of specific nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Phycology* 34: 798 – 811.
- Lourenço, S. O., Marquez, U. M. L., Mancini-Filho, J., Barbarino, E. & Aidar, E. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148: 153 – 158.
- Malavolta, E., Vitti, G. & Oliviera, S. A. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, 210 p.
- Melo, G. N., Sassi, R. & Araújo, T.F.H. 1993. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN (Bacillariophyta) em água do mar enriquecida com soluções derivadas a decomposição de algas arribadas com meio de cultura. *Revista Nordestina de Biologia* 8: 45 – 53.
- Renaud, S. M., Thinh, L. & Parry, D. L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170:147 – 159.
- Sauodi-Helis, L., Dubacq, J. P., Marty, Y., Samain, J. F. & Gudin C. 1999. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T. *Journal Applied to Phycology* 6: 315 – 322.
- Sarriés, G. A., Oliveira, J. C. V. & Alves, M. C. 1992. SANEST, Série didática nº 06, Centro de Informática da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 70 p.
- Sarruge, J. R. S. & Haag, H. P. 1974. Análises Químicas em Plantas, Piracicaba, USP-ESALQ, 65 p.
- Sipaúba-Tavares, L. H. & Rocha, O. 2001. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Rimaeditora, São Carlos 106 p.
- Southgate, P. C., Beer, A. C., Duncan, P. F. & Tamburri, R. 1998. Assessment of nutritional value of three species of tropical microalgae, dried *Tetraselmis* and a yeast-based diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture* 162: 247 – 257.
- Sukenik, A. & Whanon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition: I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 97: 61 – 72.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán Núñez, R. & Núñez Cebrero, F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering* 25: 207 – 216.
- Webb, K. L. & Chu, F.E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: Pruder, G. D. Langdon, C., Conklin, D. (ed.) *Biochemical and physiological*

approaches to shellfish nutrition. Proceedings of the Second International conference on Aquaculture Nutrition, Louisiana State University, L.A., pp. 272 – 291.

Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231 – 241.

Yamashita C. & Magalhães P. M. S. 1984. Meios de Cultura para a Alga *Chaetoceros gracilis*, Boletim de Pesquisa n. 7, EMPARN, Rio Grande do Norte, 18 p.

Yemm, E. W. & Cocking, E. C. 1955. The determination of aminoacids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209 – 213.

Yemm, E. W. & Wills, A. J. 1954. The estimation of carbohydrates by anthrone. *Biochemical Journal* 57: 508 – 514.

4.2 Composição química das microalgas *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle, em condições de cultivo semi-extensivo.

**A SER ENVIADO PARA A REVISTA ACTA OECOLOGIA -
ELSEVIER**

¹ Parte da tese de Doutorado realizado no Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Composição química de microalgas utilizadas em aquicultura: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle, em cultivo semi-extensivo¹

Alfredo Matos Moura Junior

Programa de Pós-Graduação em Botânica - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos, Recife – Pernambuco, Brasil.

alfmoura@cap.ufpe.br

Egídio Bezerra Neto

Departamento de Química/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Maria Luise Koenig

Departamento de Oceanografia/Universidade Federal de Pernambuco

Enide Eskinazi Leça

Programa de Pós-Graduação de Botânica/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas de acordo com a metodologia utilizada pela Empresa Aqualider. As espécies foram cultivadas em meio f/2 Guillard em temperatura e iluminação constantes, até atingirem o volume de 20 L em sacos de plástico. As análises foram realizadas no início da fase exponencial de crescimento. A espécie *I. galbana* apresentou a maior densidade celular ($3.295 \pm 47,73 \times 10^6$ -cel L⁻¹) com diferença significativa superior as demais espécies, o maior teor de carboidrato solúvel (0,09 mg L⁻¹), seguida por *C. gracilis* (0,06 mg L⁻¹) e por *T. weissflogii* (0,05 mg L⁻¹), também com diferenças significativas entre as três espécies e os maiores teores de nitrato (0,15 mg L⁻¹), fósforo (0,21 mg L⁻¹) e magnésio (2,90 mg L⁻¹) com diferenças significativa superior as demais espécies. *T. weissflogii* apresentou os maiores valores para sódio (6,59 mg L⁻¹), potássio (0,91 mg L⁻¹) e enxofre (0,94 mg L⁻¹). Em relação ao teor de clorofila *a*, *C. gracilis* apresentou o maior teor ($3,74 \pm 0,26$ mg L⁻¹), seguido por *I. galbana* ($1,87 \pm 0,08$ mg L⁻¹) e por *T. weissflogii* com o menor valor ($0,96 \pm 0,08$ mg L⁻¹), também com diferenças significativa entre as três espécies. As espécies apresentaram constituição química variada, o que é característico da fase de cultivo analisada.

Palavras-chaves: *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira weissflogii*, microalga, bioquímica, Brasil.

¹- Parte da tese de Doutorado realizado no Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Introdução

As microalgas são amplamente utilizadas na aquicultura como fonte de alimento para animais, em particular para larvas de moluscos, e estágios juvenis de crustáceos e peixes [9]. O maior problema associado ao uso das microalgas na aquicultura é a falta de conhecimento sobre o seu valor nutricional e os requerimentos essenciais de seus consumidores. Atualmente, mais de 40 espécies de microalgas já foram testadas como fonte de alimento para aquicultura, mas nem todas elas têm condições de suprir as exigências nutritivas ao crescimento de uma única espécie de animal. Alguns critérios nutricionais que as microalgas devem possuir para suprir as exigências animais são: não serem tóxicas, terem o tamanho apropriado para serem ingeridas, digestibilidade da parede celular e possuírem os componentes bioquímicos essenciais [4, 1].

Os carboidratos, lipídeos e proteínas presentes nas microalgas são a principal fonte de energia para o crescimento e o desenvolvimento dos animais utilizados na aquicultura [10, 11], contudo, suas concentrações podem ser influenciadas pelas condições de cultivo como temperatura, luz, salinidade, limitação de nutrientes e a idade da cultura, modificando o seu valor energético [12, 13, 18, 28].

No Brasil, a aquicultura cresce 8% ao ano, apresentando a região nordeste uma produção de 27.000 t ano⁻¹ [26]. Trabalhos conduzidos nesta região estão relacionados à produção em massa das microalgas, à descoberta de meios de cultivo para baratear os custos de produção [15, 17, 20, 22] e a estudos ecofisiológicos e bioecológicos [8]. Em relação à composição química das microalgas, pode-se citar apenas um trabalho [16], no qual os autores determinaram a composição química de *Tetraselmis tetrathele* cultivada com fertilizante orgânico.

Neste trabalho procurou-se avaliar a composição química de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas de acordo com a metodologia utilizada pela Empresa Aqualider, visando-se estimar o conteúdo nutricional das três espécies, nas condições de cultivo em escala comercial.

Material e Métodos

- Cultivo algal

Chaetoceros gracilis, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* foram cultivadas, na Empresa Aqualider (Praia do Cupe – PE) a partir de tubos de ensaio de 20 mL, em meio F/2 – Guillard [14]. Segundo o procedimento padrão da empresa, após dois dias, dois destes tubos, foram transferidos para um erlenmayer contendo 160 mL

do mesmo meio. Após mais dois dias, o volume do cultivo foi repicado, aerado e transferido para garrafas de vidro de 0,5 litro, depois do mesmo período, para sacos de plástico de 4L e por fim para sacos de 20 L permanecendo por mais dois dias. Todos os cultivos foram mantidos em condição de iluminação constante (24 horas), utilizando-se duas lâmpadas fluorescentes – tipo luz do dia de 40W cada uma, e temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 1$. Para as análises do presente trabalho, amostras de três diferentes sacos de 20 litros foram coletadas.

- Densidade celular e análises químicas

As amostras para a determinação da densidade celular e dos parâmetros bioquímicos foram retiradas na fase exponencial de crescimento. Para a determinação da densidade celular, uma amostra de cada saco foi coletada e fixada em formol neutro a 4 %. No Laboratório de Cultivo de Microalgas da Universidade Federal de Pernambuco, com o auxílio de uma Câmara de Neubauer e microscópio binocular Zeiss, foi determinado o número de células por mL e posteriormente, transformado para células por litro.

As determinações dos parâmetros químicos foram realizadas no laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para determinação da concentração de clorofila *a*, foram utilizadas 20 mL de cada amostra, as quais foram filtradas com três repetições, em filtros Whatmann GF/F de fibra de vidro, de 47 mm de diâmetro. A extração foi efetuada com acetona a 90 % e as leituras foram efetuadas num espectrofotômetro, adotando-se os procedimentos descritos em Becker [1].

O restante do cultivo foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos, recolhendo-se o material precipitado, o qual foi seco em estufa até peso constante à temperatura de 60°C , conforme procedimento recomendado por Bezerra Neto *et al.* [2].

Para análise de carboidratos solúveis, proteína solúvel e nitrato, pesou-se 1,0 g do material seco e preparou-se um extrato acrescentando-se 10 mL de água destilada. Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método descrito por Yemm & Wills [31]. Para tal, pipetou-se para um tubo de ensaio 200 μL do extrato e acrescentou-se 2 mL do reagente antrona, para o desenvolvimento da cor que ocorreu em banho maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm,

comparando-se os resultados das leituras das amostras com os resultados das leituras de soluções padrões de glucose na faixa de concentração entre 0 e 300 mg.L⁻¹.

Proteína solúvel foi analisada pelo método de Bradford [3], recolhendo-se 100 µL do extrato de algas para um tubo de ensaio e acrescentando-se 2,0 mL do reagente *coomassie* azul brilhante. Após o desenvolvimento da cor, efetuou-se as leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 595 nm, comparando-se os resultados com soluções padrões de albumina bovina (BSA) na faixa de concentração de 0 a 200 mg.L⁻¹ e aminoácidos totais livres foram determinados pelo método descrito por Yemm & Cocking [30].

A análise de nitrato foi realizada pelo método descrito por Cataldo *et al.* [6], pipetando-se 200 µL do extrato para um tubo de ensaio e acrescentando-se 800 µL do reagente ácido salicílico (a 5 % em H₂SO₄). Após 20 minutos acrescentou-se 18 mL de NaOH (2 N) e, em seguida, procedeu-se às leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 410 nm. Os resultados foram comparados com soluções padrões do nitrato na faixa de concentração de 0 a 300 mg.L⁻¹.

Os elementos químicos sódio e magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, de acordo com a metodologia de Malavolta *et al.* [19]. O enxofre foi determinado por turbidimetria, segundo Sarruge & Haag [24], o fósforo pelo método colorimétrico do molibdo-vanadato de amônio e o potássio por fotometria de chama, segundo Bezerra Neto *et al.* [2].

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SANEST [25]. Inicialmente realizou-se a análise de variância para cada variável estudada. Nos casos em que o teste F mostrou efeito significativo, procedeu-se o teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de 5 % de probabilidade.

Resultados

- *Chaetoceros gracilis*

A densidade celular média de *Chaetoceros gracilis* foi de $2.450 \pm 70,71 \times 10^6$ cel L⁻¹ (fig. 1), o teor de clorofila *a* foi de $3,74 \pm 0,26$ mg L⁻¹, o de carboidrato solúvel foi de 0,06 mg L⁻¹, aminoácidos totais livres foi de $2,87 \pm 0,31$ mg L⁻¹ e proteína solúvel foi de $0,03 \pm 0,01$ mg L⁻¹ (fig. 2). Em relação aos teores de sais, nitrato apresentou valores médios de $0,05 \pm 0,02$ mg L⁻¹; sódio, 5,18 mg L⁻¹; potássio, 0,55 mg L⁻¹; fósforo, 0,13 mg L⁻¹; magnésio, $2,13 \pm 0,10$ mg L⁻¹ e enxofre, $0,38 \pm 0,13$ mg L⁻¹ (tab. 1).

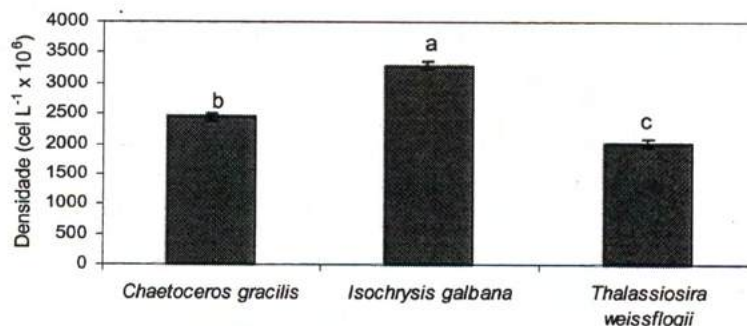


Figura 1 –Densidade celular média (cel L⁻¹ x 10⁶) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* cultivadas em saco de plástico com meio F/2 – Guillard. Letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

- *Isochrysis galbana*

Esta espécie apresentou densidade celular média de $3.295 \pm 47,73 \times 10^6$ cel L⁻¹ (fig. 1). O teor médio de clorofila *a* foi de $1,87 \pm 0,08$ mg L⁻¹, o de carboidrato solúvel, 0,09 mg L⁻¹, o de proteína solúvel, $0,008 \pm 0,005$ mg L⁻¹ e o de aminoácidos totais livres, $1,78 \pm 0,07$ mg L⁻¹ (fig. 2). Em relação aos sais, o nitrato apresentou valores médios de $0,15 \pm 0,09$ mg L⁻¹, sódio de 3,75 mg L⁻¹, potássio de 0,52 mg L⁻¹, fósforo de 0,21 mg L⁻¹, magnésio de $2,90 \pm 0,03$ mg L⁻¹ e enxofre de $0,56 \pm 0,10$ mg L⁻¹ (tab. 1).

- *Thalassiosira weissflogii*

A densidade celular média de *Thalassiosira weissflogii* foi de $2.018 \pm 79,55 \times 10^6$ cel L⁻¹ (fig. 1), o teor médio de clorofila *a* foi de $0,96 \pm 0,08$ mg L⁻¹, o de carboidrato solúvel foi de 0,05 mg L⁻¹, o de proteína solúvel foi de 0,002 mg L⁻¹ e o de aminoácidos totais livres foi de $3,54 \pm 0,60$ mg L⁻¹ (fig. 2). Para os sais, obteve-se valores médios de $0,03 \pm 0,01$ mg L⁻¹ para o nitrato, 6,59 mg L⁻¹ para o sódio, 0,91 mg L⁻¹ para o potássio, $0,12 \pm 0,001$ mg L⁻¹ para o fósforo, $1,99 \pm 0,07$ mg L⁻¹ para o magnésio e $0,94 \pm 0,05$ mg L⁻¹ para o enxofre (tab. 1).

Discussão

Segundo Becker [1] a densidade celular, os teores de clorofila *a* e de proteína são parâmetros úteis para determinar a produtividade do cultivo. De acordo com os

dados encontrados, *I. galbana* apresentou a maior densidade celular ($3.295 \pm 47,73 \times 10^6$ cel L⁻¹), com diferença significativa superior as demais espécies ($P < 0,05$), e estes valores são menores do que aqueles encontrados, normalmente, na literatura [4, 5, 12, 21, 23, 29], devido à fase de cultivo analisada, já que as análises foram realizadas no início da fase exponencial, onde as células ainda estão no início de seu desenvolvimento. Os autores acima citados analisaram amostras no final da fase exponencial de cultivo, onde as células já se duplicaram e se desenvolveram ao máximo.

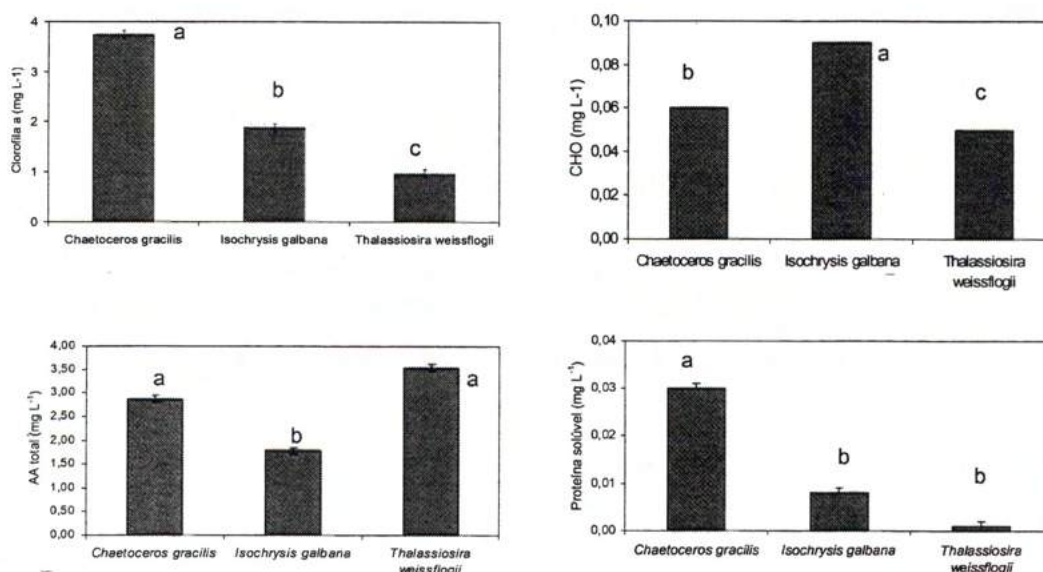


Figura 2 – Composição química de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* cultivadas em saco de plástico com meio f/2 – Guillard. Letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Tabela 1 - Valores médios ($\pm$ d.p.) dos teores de sais em *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* cultivadas em saco de plástico com meio f/2 – Guillard (n=3).

	<i>Chaetoceros gracilis</i> mg L ⁻¹	<i>Isochrysis galbana</i> mg L ⁻¹	<i>Thalassiosira weissflogii</i> mg L ⁻¹
Nitrato	0,05 $\pm$ 0,02 ^b	0,15 $\pm$ 0,09 ^a	0,03 $\pm$ 0,01 ^b
Sódio	5,18 ^b	3,75 ^c	6,59 ^a
Potássio	0,55 ^b	0,52 ^c	0,91 ^a
Fósforo	0,13 ^b	0,21 ^a	0,12 $\pm$ 0,001 ^b
Magnésio	2,13 $\pm$ 0,10 ^b	2,90 $\pm$ 0,03 ^a	1,99 $\pm$ 0,07 ^b
Enxofre	0,38 $\pm$ 0,13 ^b	0,56 $\pm$ 0,10 ^{a,b}	0,94 $\pm$ 0,05 ^a

Entre as linhas, médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5%.

Em relação ao teor clorofila *a*, houve diferença significativa entre as três espécies ($P < 0,05$), onde *C. gracilis* apresentou o maior valor ($3,74 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$), seguida por *I. galbana* ($1,87 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. weissflogii* com o menor valor ($0,96 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$). Estes valores são equivalentes aos determinados por Brown [4], cultivando *C. gracilis* em meio f/2, o teor de clorofila *a* foi de $0,78 \text{ pg de clorofila } a \text{ cel}^{-1}$ e por Nelson *et al.* [21] cultivando *I. galbana* também em meio F/2, o teor de clorofila *a* foi de $2,40 \text{ mg L}^{-1}$. Ambos realizaram suas medições no final da fase Log de crescimento e Valenzuela-Espinoza *et al.* [27] também cultivando *I. galbana* em meio f/2 em saco plástico de 18 litros, o teor de clorofila *a*, no segundo dia de cultivo, foi de $0,1 \text{ pg de clorofila } a \text{ cel}^{-1}$.

As microalgas produzem uma ampla variação de carboidratos que, na sua maioria, são produtos de reserva (amido, crisolaminarina, paramido) ou atuam no equilíbrio osmótico [5], além de possuírem um alto valor calórico, constituindo uma valiosa fonte energética para os consumidores [7]. No presente trabalho, *I. galbana* apresentou o maior valor de carboidrato solúvel ($0,09 \text{ mg L}^{-1}$), seguida por *C. gracilis* ($0,06 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. weissflogii* ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) com diferenças altamente significativas entre as três espécies ($P < 0,05$). Estes baixos valores provavelmente indicam que as células possuem um baixo estoque de material de reserva, o que é característico da fase analisada. Estes dados estão de acordo com a literatura [1, 23, 27] onde afirmam que o teor de proteínas é maior durante a fase exponencial e o teor de carboidrato é maior durante a fase estacionária, quando, as células são mais velhas.

Em relação ao teor de proteína solúvel, *C. gracilis* apresentou maior teor ($0,03 \pm 0,001 \text{ mg L}^{-1}$), com diferença significativa entre as demais espécies ($P < 0,05$), seguida por *I. galbana* ($0,01 \pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. weissflogii* ($0,002 \text{ mg L}^{-1}$). Estes valores estão de acordo com os obtidos por Valenzuela-Espinoza *et al.* [27] cultivando *I. galbana*, no segundo dia de cultivo, o teor de proteína foi de $4 \text{ pg de proteína } \text{cel}^{-1}$.

Os teores de aminoácidos totais livres seguiram o mesmo padrão do teor de proteína solúvel: *C. gracilis* ($2,87 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$), *I. galbana* ($1,78 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$) e *T. weissflogii* ($3,54 \pm 0,60 \text{ mg L}^{-1}$), havendo diferença altamente significativa de *T. weissflogii* ($P < 0,05$).

Em relação aos teores de sais, *I. galbana* apresentou os maiores teores de nitrato, fósforo e magnésio com diferenças significativas superiores às demais espécies ($P < 0,05$) e *T. weissflogii* apresentou os maiores valores para sódio ($P < 0,05$), potássio

($P < 0,05$) e enxofre ($P < 0,05$) (tab. 1). Como era de se esperar, os teores de sódio e magnésio foram os maiores nas três espécies, provavelmente devido à disponibilidade destes sais, já que o cultivo é realizado com água do mar e estes elementos constituem a maior parte dos sais marinhos na forma de NaCl e $MgCl_2$ [1].

Conclusões

As diferenças no conteúdo da biomassa, número de células por litro, quantidade de proteína e carboidrato solúveis, aminoácido totais livres e sais, nas microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* foram bastante significativas, comprovando-se que as espécies, apesar de cultivadas em um mesmo tipo de recipiente, produzem diferentes teores dos seus componentes químicos.

No caso de cultivo em meio f/2 - Guillard em saco de plástico de 20 litros, a espécie que apresentou o melhor rendimento foi *Chaetoceros gracilis*, que produziu elevados teores de clorofila *a*, proteína e carboidratos solúveis e aminoácidos totais livres, representando uma espécie com perspectivas para aproveitamento na aquicultura.

A espécie *Thalassiosira weissflogii* apresentou o menor rendimento, tendo produzido valores significativamente mais baixos nos compostos analisados.

Referências bibliográficas

- [1] Becker E W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology, New York, Cambridge University Press, 1995, 293 p.
- [2] Bezerra Neto E., Andrade A. G., Barreto L. P. Análise Química de Tecidos e Produtos Vegetais, Recife, UFRPE, 1994. 99 p.
- [3] Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248 – 254.
- [4] Brown M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture, *J. Exp. Biol. Ecol.*, 145 (1991) 79-99.
- [5] Brown M. R., Jeffrey S. W., Volkman J. K., Dunstan G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture*, 151 (1997) 315 – 331.
- [6] Cataldo D. A., Harron M., Schrader L., Youngs V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant and tissue by nitration of salicylic acid, *Commun. Soil Science and Plant Analysis*, 6 (1975) 71 - 80.

- [7] Chu F. L. E., Dupuy J. L., Webb K. L. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*, *Aquaculture*, 29(1982) 241 – 252.
- [8] Costa R. A. A. M., Koenig M. L., Feitosa F. A. N. Influência de diversas concentrações de cloro nas populações fitoplanctônicas do estuário do rio Botafogo (Itamaracá - PE), *Arq. Biotec. Tecnol.*, 37 (1994) 877 – 888.
- [9] De Pauwn N., Persoone G. Micro-algae for aquaculture, in: Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. (Ed.) *Micro-algal Biotechnology*, Sydney, Cambridge University Press, 1988 cap. 08, 477 p.
- [10] Fabregas J., Herrero C., Cabezas B., Abalde J. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch with high nutrients concentrations, *Aquaculture*, 49 (1985a) 231-244.
- [11] Fabregas J., Herrero C., Abalde J., Cabezas B. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations, *Aquaculture*, 50 (1985b) 1-11.
- [12] Fidalgo J. P., Cid A., Torres E., Sukenik A., Herrero C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalgae *Isochrysis galbana*, *Aquaculture*, 166 (1998) 105 – 116.
- [13] Goldman J. C. Physiological aspects in algal mass cultures, in: Shelef G., Soeder C. J. (Ed.), *Algae Biomass*, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980, pp. 343 - 359.
- [14] Guillard R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, *Culture of Marine Invertebrate Animal*, (1975) 29 – 60.
- [15] Koenig M. L., Lacerda S. R., Passavante J. Z. O. Cultivo em laboratório de *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis tetrathele* (Chlorophyceae) com fertilizantes orgânicos, *Arq. Biolog. Tecnol.*, 33 (1990a) p. 91 - 103.
- [16] Koenig M. L., Maia P. R., Campos-Takaki G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico, *Revista Biológica Brasileira*, 2 (1990b) 23 – 38.
- [17] Koenig M. L., Passavante J. Z. O., Bartolomeu C. C., Costa K. M. P. O vinhoto no cultivo de microalgas. *Gayana*, 45 (1998) 253 - 263.
- [18] Lourenço S. O., Marquez U. M. L., Mancini-Filho J., Barbarino E., Aida E., Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparision of two culture media, *Aquaculture*, 148 (1997) 153 – 158.
- [19] Malavolta E., Vitti G., Oliviera S. A., Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989, 210p.

- [20] Melo G. N., Sassi R., Araújo T.F.H. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN (Bacillariophyta) em água do mar enriquecida com soluções derivadas a decomposição de algas arribadas com meio de cultura, Revista Nordestina de Biologia, 8 (1993) 45 – 53.
- [21] Nelson J.R., Guarda S., Cowell L.E., Heffernan P.B. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30 °C, Aquaculture, 106(1992) 357 – 377.
- [22] Oliveira A. A. G., Koenig M. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos, Arg. Biol. Tecnol., 27 (1984) 293 - 298.
- [23] Renauld S. M., Thinh L., Parry D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. Aquaculture, 170 (1999) 147 - 159.
- [24] Sarriés, G. A., Oliveira, J. C. V., Alves, M. C. SANEST, Série didática nº 06, Centro de Informática da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992, 70 p.
- [25] Sarruge J. R. S., Haag H. P. Análises Químicas em Plantas, Piracicaba, USP-ESALQ, 1974, 65 p.
- [26] Valenti W. C., Poli R. R., Pereira J. A., Borghetti J. R. Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, 2000, 399 p.
- [27] Valenzuela Espinoza, E., Millán Núñez R., Núñez Cebrero F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium, Aquacultural engineering, 25 (2002) 207 – 216.
- [28] Whyte J. N. C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, 60 (1987) 231 - 241.
- [29] Yamashita C., Magalhães P. M. S. Meios de Cultura para a Alga *Chaetoceros gracilis*, Boletim de Pesquisa n. 7, EMPARN, Rio Grande do Norte, 1984, 18 p.
- [30] Yemm E. W., Cocking E. C. The determination of aminoacids with ninhydrin, Analyst, 80 (1955) 209 - 213.
- [31] Yemm E. W., Wills A. J. The estimation of carbohydrates by anthrone, Biochemical Journal, 57(1954) 508 – 514.

5 DISCUSSÃO GERAL

Como nos vegetais superiores, a composição química das microalgas não é constante, podendo variar de acordo com as condições do ambiente, o que influencia na sua biomassa. Estas mudanças na composição química são respostas às variações na temperatura, luminosidade, aeração, tempo de cultivo, pH do meio de cultivo, quantidade e tipos de nutrientes e CO₂ (Becker, 1995).

A estimativa da biomassa produzida é um dos parâmetros básicos para o monitoramento da produção as microalgas. O crescimento algal é geralmente expresso em aumento de biomassa, número de células, quantidade de proteínas, turbidez, entre outros, em um determinado período de tempo. Heussler (1985), cultivando *Scenedesmus obliquus* em larga escala, apresentou um recorde de produção atingindo 54 gramas de biomassa seca por m² por dia, chegando a 90 t por hectare ao ano.

As espécies analisadas, no presente trabalho, foram cultivadas até o final da fase exponencial de crescimento (oito dias de cultivo), para o cultivo em garrafão de vidro e, para o cultivo em saco de plástico, as espécies foram cultivadas até o início da fase exponencial de crescimento (dois dias de cultivo), de acordo com a metodologia empregada pela Empresa Aqualider.

Em relação à densidade celular, o meio utilizado (f/2-Guillard) mostrou-se bastante eficiente para as microalgas analisadas, as quais apresentaram elevados números de células por litro. Esses valores podem variar de acordo com o recipiente de cultivo, ou seja, garrafão de vidro ou sacos de plástico. Destaca-se, por exemplo, *C. gracilis* que, no cultivo em garrafão de vidro, apresentou o melhor resultado ($8.442 \pm 7,07 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$), superior a *T. gracilis* ($562 \pm 19,45 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$), havendo diferença bastante significativa entre as duas espécies ($P < 0,05$).

Valores similares de densidade ($95 - 6.415 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$) foram obtidos por Yamashita & Magalhães (1984), cultivando *C. gracilis* em condições semelhantes, mas com meio FeNS, e por Lourenço *et al.* (1997) cultivando *T. gracilis* em meio Conway, obtendo valor máximo de densidade, em torno de $150 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$, também em condições similares.

Em relação à densidade celular no cultivo em saco de plástico, *I. galbana* apresentou a maior densidade celular ($3.295 \pm 47,73 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$), com diferença significativa superior às demais espécies ($P < 0,05$), seguida por *C. gracilis* e por *T. weissflogii*. Estes valores são menores que os encontrados por Brown (1991), cuja densidade celular em *C. gracilis* foi de $1,90 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$ e em *I. galbana* $3,06 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$; por Nelson *et al.* (1992), que obteve para *C. gracilis* máximo de $8,13 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$ e para *I. galbana*, máximo de $9,20 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$; por Fidalgo *et al.* (1998), cujo a densidade máxima *I. galbana* chegou a $25 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$; por Renaud *et al.* (1999), com *I. galbana*, atingindo $1,69 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$ e por Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002), também com *I. galbana*, atingindo $5,19 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$. Essa baixa

densidade celular determinada nas espécies deve-se à fase de cultivo analisada, já que as análises foram realizadas no início da fase exponencial, onde as células ainda estão no início de seu desenvolvimento enquanto que os autores acima citados, analisaram amostras ao final da fase exponencial.

Apesar de quando comparados a bibliografia, os valores de células por litro serem considerados baixos, as espécies apresentaram valores na ordem de 10^6 células por litro, o que é ocasionado pela alta taxa de crescimento destas microalgas já determinada por vários autores como, por exemplo, Nelson *et al.* (1992), os quais observaram que a taxa de crescimento de *I. galbana* foi maior (0,87 divisões por dia) na temperatura de 30°C em baixo nível de irradiação; Brown *et al.* (1998), determinaram que a taxa de crescimento de *I. galbana* é de 0,48 div. dia⁻¹; Caers *et al.* (1999) determinaram que a taxa de crescimento de *I. galbana* é de 6,82 div. dia⁻¹ quando associada a *Tetraselmis suecica*; Reanud *et al.* (1999) determinaram que a taxa de crescimento em *I. galbana* é de 0,47 div. dia⁻¹ e de *Chaetoceros* sp. é de 0,56 div. dia⁻¹ e Brown & Robert (2002) determinaram que a taxa de crescimento de *I. galbana* foi maior (0,1 volume celular por dia) quando cultivada por 16 horas com *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*.

A descoberta do potencial produtivo das microalgas em relação à proteína foi um fator essencial para o desenvolvimento da aquicultura mundial (Borowitzka, 1988). Segundo Becker (1995), a taxa de proteína nas microalgas pode variar de 6 a 71 % de matéria seca. Valores muito superiores, quando comparados ao arroz (8 % de matéria seca), ao leite (26% de matéria seca) e a soja (37% de matéria seca).

Tornou-se difícil efetuar-se a comparação do teor proteico das microalgas devido as diversas metodologias empregadas pelos autores. Os métodos mais comumente utilizados são os de *Bradford* (Bradford, 1976) e o de *Lowry* (Lowry *et al.*, 1951), os quais dosam apenas as proteínas solúveis das células. Outro método bastante utilizado é o Kjeldahl (AOAC, 1990), o qual determina o teor de proteína bruta através da quantificação do nitrogênio existente em materiais das mais variadas composições.

No presente trabalho, foi apenas determinado o teor de proteína solúvel, pela pequena quantidade de material disponível para as análises. Entretanto, no cultivo em garrafão de vidro, o teor de proteína solúvel foi significativamente diferente ($P < 0,05$) para *C. closterium*, a qual apresentou o maior valor ($0,62 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$), seguida por *C. gracilis* ($0,58 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. gracilis* ($0,38 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$).

No cultivo em sacos de plástico, *C. gracilis* apresentou também o maior teor de proteína solúvel ($0,03 \pm 0,001 \text{ mg L}^{-1}$), com diferença significativa entre as espécies ($P < 0,05$), seguida por *I. galbana* ($0,01 \pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$) e por *T. weissflogii* ($0,002 \text{ mg L}^{-1}$).

Em ambos experimentos era de se esperar teores mais altos de proteína solúvel, principalmente no cultivo em sacos de plástico, onde as análises foram realizadas durante o início da fase exponencial, caracterizada, segundo Becker (1995), por altos teores de proteína e baixos teores de carboidratos e lipídeos, como os também determinados por *Koenig et al.* (1990), cultivando *T. tetrathele*, determinaram que o teor de proteína solúvel foi de $310 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, o de carboidrato total foi de $209,80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e o

teor de lipídeo foi de 28,50 μg e, Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) cultivando *I. galbana* também em meio com fertilizante agrícola, determinaram que o teor de proteína foi de 7,6 pg cel^{-1} .

Os teores de aminoácidos totais livres foram superiores aos teores de proteína solúvel, tendo, no cultivo em garrafão de vidro se destacado a espécie *C. closterium* com produção de $23,28 \pm 0,84 \text{ mg L}^{-1}$, seguida por *C. gracilis* ($5,25 \pm 1,40 \text{ mg L}^{-1}$) e *T. gracilis* ($1,49 \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1}$), com diferenças significativa entre as espécies ($P < 0,05$) enquanto que, para o cultivo em sacos de plástico, *C. gracilis* atingiu $2,87 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$, *I. galbana*, $1,78 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$ e *T. weissflogii*, $3,54 \pm 0,60 \text{ mg L}^{-1}$, havendo diferença significativa para *T. weissflogii* ($P < 0,05$). Provavelmente, um dos fatores que contribuíram para isto tenha sido a iluminação constante em ambos experimentos, fazendo com que as células produzam constantemente mais aminoácidos para a síntese proteica.

Além da quantidade de proteína produzida pelas microalgas, os tipos de aminoácidos que as formam influem na sua qualidade nutricional. Segundo Webb & Chu (1983), o teor de aminoácido total das microalgas tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento dos bivalves, como também a quantidade e qualidade de lipídeo. A deficiência de alguns ácidos graxos tais como o omega-3, indica que a microalga tem um baixo valor nutricional.

De acordo com Brown *et al.* (1997), o valor nutricional de uma proteína é considerado alto se a composição química dos aminoácidos totais livres estiver próximo às necessidades nutricionais do animal a ser alimentado.

Segundo Cohen (1999), as proteínas e os aminoácidos são, portanto, componentes químicos produzidos pelas microalgas que também podem dar origem a outras substâncias químicas e, através do melhoramento genético, aumentar as suas produções.

Em relação ao teor de proteína bruta, Moura Junior *et al.* (2001), cultivando algumas das espécies aqui estudadas, determinaram que a taxa de proteína bruta para *C. gracilis*, cultivada em tanque externo de 3.500 L, foi de 15,79 % de matéria seca e para *T. gracilis*, também cultivada em garrafão de vidro, foi de 37, 63 % de matéria seca, reforçando a possibilidade de que estas espécies podem ser utilizadas como fonte alternativa de proteína, sendo necessário, portanto, para esta substituição, a realização de vários outros testes como palatabilidade e digestibilidade.

De acordo com Spectorova *et al.* (1982), a clorofita *Dunaliella tertiolecta* apresenta composição química celular composta de 50 % de proteína, 20 % de carboidrato e 8 % de lipídeos, mudando, de acordo com as condições de crescimento. Já Thomas *et al.* (1984), determinaram que a produção e a eficiência fotossintética de *D. primolecta* foi maior em cultivo contínuo N-suficiente, alcançando valores de $12 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ com eficiência de 4,3 %. Em cultivo onde o nitrogênio foi limitante, houve uma redução da taxa de proteína de 60 % para 25 %, aumento dos teores de carboidrato, de

12 % para 50 % enquanto que não houve mudança significativa nos teores de lipídeos.

Já algumas algas do gênero *Scenedesmus* podem alcançar entre 50 e 56% de proteína bruta, sendo consideradas algas de alta produtividade (Soeder & Hegewald, 1988).

De acordo com Richmond (1988), as proteínas das microalgas são pouco utilizadas quando estas são ingeridas intactas por animais monogástricos ou humanos. A digestibilidade das microalgas do gênero *Spirulina*, tem sido testada em diferentes experimentos em animais através da determinação da taxa de eficiência protéica (PER). Becker *et al.* (1976) compararam a PER de *Scenedesmus* com *Spirulina* ambas secas por diferentes métodos, onde os valores da PER de *Spirulina* seca ao sol foram maiores do que os de *Scenedesmus*, concluindo que *Spirulina* pode entrar na dieta alimentar de animais.

Além das clorofilas (a, b, c₁ e c₂), as microalgas possuem pigmentos acessórios como as ficobiliproteínas (ficobilinas, ficoeretrinas) e uma ampla variação de carotenóides. Em algumas espécies, os pigmentos acessórios ou secundários estão presentes em maior quantidade do que os pigmentos primários (Borowitzka, 1988).

Em relação a clorofila *a* no cultivo em garrafão de vidro, *C. closterium* obteve melhor resultado médio (13,76 mg L⁻¹), seguida por *T. gracilis* (7,12 mg L⁻¹) e por *C. gracilis* (3,28 mg L⁻¹), havendo diferença significativa entre as três espécies (P<0,05). Estes valores são superiores aos encontrados por Lourenço *et al.* (1997), cultivando *T. gracilis* em meio Conway (1,51 – 3,57

mg L⁻¹) e equivalentes aos determinados por Brown (1991), cultivando *C. gracilis* em meio F2 (0,78 pg cel⁻¹). O alto valor de clorofila *a* deveu-se, provavelmente, a alta densidade celular, o que diminuiu a irradiação dentro do garrafão, fazendo com que as células produzissem mais clorofila, como também foi observado por López-Muñoz *et al.* (1992), Saoudis-Helis *et al.* (1999) e Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002).

Já no cultivo em saco plástico, houve diferença significativa entre as três espécies ($P < 0,05$), tendo *C. gracilis* apresentado maior valor (3,74 mg L⁻¹), seguida por *I. galbana* (1,87 mg L⁻¹) e por *T. weissflogii* com o menor valor (0,96 mg L⁻¹). Estes valores são bem próximos aos encontrados na literatura, como exemplo Brown (1991), cultivando *C. gracilis* em meio F2, o teor de clorofila *a* foi de 0,78 pg cel⁻¹ e Nelson *et al.* (1992), cultivando *I. galbana* encontraram o valor de 2,40 mg L⁻¹. Nestes trabalhos, os autores realizaram as análises no final da fase Log de crescimento.

Os valores de clorofila *a* encontrados no cultivo em saco de plástico, devem-se, provavelmente, ao tempo de repicagem utilizado pela Empresa (a cada dois dias), caracterizando células ainda jovens, que “acabaram” de se dividir, encontradas durante a fase de cultivo analisada.

As microalgas produzem uma ampla variação de carboidratos que, na sua maioria, são produtos de reserva (amido, crisolaminarina, paramido) ou atuam no equilíbrio osmótico (glicerol, manitol, sorbitol) (Borowitzka, 1988). Por possuírem alto valor energético, os carboidratos também constituem uma valiosa fonte de alimento, sendo o seu principal representante a glucose

seguida pela galactose e manose. Mas, estes últimos podem variar de acordo com a espécie estudada (Chu *et. al.*, 1982).

No presente trabalho, em relação ao teor de carboidrato solúvel no cultivo em garrafão de vidro, o maior valor foi determinado em *C. gracilis* (0,1 mg L⁻¹), seguida por *C. closteirum* (0,09 mg L⁻¹) e por *T. gracilis* (0,06 mg L⁻¹), significativamente diferente das duas primeiras (P<0,05). Estes valores são considerados baixos para a fase de cultivo analisada (final da fase exponencial), onde as espécies tendem a acumular carboidrato, como resposta à limitação do nitrogênio utilizado durante a fase Log para a síntese de proteína, diminuindo a quantidade desta última (Brown, 1991; Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999).

No cultivo em saco de plástico, *I. galbana* apresentou o maior valor para carboidrato solúvel (0,09 mg L⁻¹), seguida por *C. gracilis* (0,06mg L⁻¹) e por *T. weissflogii* (0,05 mg L⁻¹), com alta diferença significativa entre as três espécies (P<0,05). Estes baixos valores provavelmente indicam que as células possuem um baixo estoque de material de reserva, por ainda se encontrarem no início da fase exponencial. Estes dados estão de acordo com a literatura, onde os autores afirmam que o teor de proteínas é maior durante a fase exponencial e o teor de carboidrato é maior durante a fase estacionária quando, as células são mais velhas (Becker, 1995; Renaud, 1999; Valenzuela-Espinoza, 2002).

A maioria das microalgas produz carboidratos que podem ser utilizados na indústria e no comércio. *Chlamydomonas mexicana*, por exemplo, que de sua produção orgânica total libera acima de 25% de

carboidrato extracelular é, ainda, usada para o condicionamento de solo nos Estados Unidos (Lewin, 1956). Em relação à fase de crescimento, algumas algas liberam mais carboidrato durante a fase Log (*Chlamydomonas* spp., entre 15% e 57% da produção total; *Katodinum dorsalisulcum*, aproximadamente 90% e *Anabaena flos-aquae*, 28 %) (Moore & Tischer, 1964). Já em outras, a maior produção ocorre durante a fase estacionária como em *Dunaliella tertiolecta*, *D. salina*, *Isochrysis galbana*, *Prymnesium parvum*, *Pyramimonas* sp. (Weissmann & Bennemann, 1980).

Informações sobre a composição bioquímica de uma espécie de microalga podem levar a diferenças expressivas entre os parâmetros analisados. Este fato decorre das diferenças de metodologias de dosagens aplicadas, do próprio estado fisiológico das culturas, mas também é bastante influenciado pela composição do meio de cultura empregado (Cohen, 1999).

O meio de cultura utilizado tem que possuir os nutrientes necessários para suportar o crescimento algal. Dentre estes, uns são denominados macronutrientes ou nutrientes essenciais ao desenvolvimento, geralmente encontrados em quantidades significativas (oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e enxofre), outros são denominados de micronutrientes ou nutrientes requeridos em pequenas quantidades pelos organismos (ferro, boro, cobre, cobalto, zinco, vanádio, molibdênio e sódio) e, a capacidade das algas em utilizar estes compostos, depende de como estes serão absorvidos e metabolizados (Cohen, 1999).

Dentre os macronutrientes, o nitrogênio e o fósforo são os mais importantes, pois entram na constituição química de várias substâncias

celulares, influenciando a sua composição química (Lourenço *et al.*, 1998) e a síntese e a acumulação de proteínas e de carboidratos (Fabregas *et al.*, 1985 a, b).

Segundo Fabregas *et al.* (1986), durante os períodos de suficiência de nitrogênio (como a fase exponencial de crescimento), ocorre intensa produção e acumulação de proteínas, ao passo que baixas concentrações de carboidratos tendem a ser encontradas; contrariamente, em períodos em que o nitrogênio disponível às culturas é reduzido, a acumulação de carboidratos cresce e a produção de proteína diminui.

De acordo com Sipaúba-Tavares & Rocha (2001), a capacidade das algas em utilizar o nitrogênio sob a forma orgânica depende de sua possibilidade de assimilar o composto inteiro, ou desaminá-lo e utilizar a amônia formada.

Em relação aos teores de sais intracelulares, no cultivo em garrafão de vidro, *C. closterium* apresentou os maiores valores para o nitrato (0,365 mg L⁻¹) com alta diferença significativa das outras duas espécies (P<0,05), o sódio (0,46 mg L⁻¹) com a maior diferença significativa entre as três espécies (P<0,05) e o fósforo (2,80 mg L⁻¹), diferente significativamente de *T. gracilis* (P<0,05). Os teores de potássio (0,02 mg L⁻¹) e enxofre (0,03 mg L⁻¹) foram iguais entre *C. gracilis* e *C. closterium*. A espécie *T. gracilis* apresentou o menor teor de sais, com maior diferença significativa para o potássio (P<0,05).

No cultivo em saco plástico, *I. galbana* apresentou os maiores teores de nitrato, fósforo e magnésio com diferenças significativas superiores as

demais espécies ($P < 0,05$) e *T. weissflogii* apresentou os maiores valores para sódio ($P = 0,00001$), potássio ($P = 0,00001$) e enxofre ($P = 0,0228$).

Uma análise comparativa destes dados tornou-se impossível devido à escassez de trabalhos publicados com microalgas marinhas. Todos os trabalhos pesquisados relacionados à composição química das microalgas estão direcionados à quantificação e determinação dos tipos de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas. Entretanto, Lourenço *et al.* (1998), cultivando 10 espécies de microalgas em meio Conway, apresentam dados de nitrito, nitrato e amônia intracelular em diferentes estágios de cultivo. Entre as dez espécies, *I. galbana* apresentou maior valor para nitrato e nitrito no final da fase exponencial (0,73 e 0,38 fentogramas por célula, respectivamente) e maior valor para amônia no meio da fase exponencial (0,41 fentogramas por célula) e *T. gracilis* apresentou os maiores valores para nitrito e amônia no meio da fase exponencial (21,6 e 25,3 fentogramas por célula, respectivamente) e maior valor para nitrato no final da fase exponencial (17,9 fentogramas por célula). Os autores observaram ainda, que o nitrato foi mais consumido na fase estacionária na curva de crescimento.

No geral, no cultivo em garrafão de vidro, as diatomáceas *C. gracilis* e *C. closterium* apresentaram os melhores resultados em todos os parâmetros analisados, fato também observado no cultivo em sacos de plástico, onde *C. gracilis* e *T. weissflogii* também apresentaram os melhores resultados na maioria dos parâmetros analisados e, a haptofícea *I. galbana*, obteve os melhores resultados em densidade, carboidrato solúvel, fósforo e magnésio.

Em relação à metodologia empregada pela Empresa Aqualider, e de acordo com os resultados encontrados, esta se mostrou satisfatória na maioria dos parâmetros observados, quando analisados com outros tipos e fases de cultivo celular. As espécies produziram densidade celular equivalente aos outros tipos de produção, com variações bastante significativas dos teores bioquímicos entre estas.

De acordo com estas variações bioquímicas, seria interessante um estudo mais detalhado do “poder” de produção destas espécies em relação às suas curvas de crescimento para se determinar em qual “momento” haverá uma maior produção de um determinado componente químico.

Ainda devido a essa variação nos teores bioquímicos entre as espécies, outro fato a ser trabalhado seria a mistura destas microalgas vivas ou secas (em forma de ração), para compor uma dieta mais balanceada, promovendo assim, o melhor desenvolvimento animal em um menor período de tempo.

Como se pode observar, as microalgas produzem uma diversidade de substâncias químicas com amplo espectro de utilização comercial e industrial. Apesar disto, o número de algas em escala de produção comercial ainda é baixo. A utilização destas, como fonte nutritiva, pode solucionar vários problemas nutricionais, entretanto, os custos associados com o tempo de crescimento e o tipo de coleta utilizado associados, quando necessário, à extração e purificação de produtos inibem o desenvolvimento desta atividade, como o observado por Benemann & Weissman (1984), onde o custo estimado de produção pode variar entre U\$ 0.5 e U\$1.5 kg⁻¹.

Como as microalgas foram cultivadas dentro das mesmas condições, a variação na composição química encontrada pode ser atribuída a fatores genéticos, como também ao estado fisiológico no qual se encontravam no momento da coleta para as análises bioquímicas.

5.1 Conclusões

- ♦ A pesquisa demonstrou que as microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* e *Thalassiosira weissflogii* apresentam diferenças bastante significativas nos teores de seus compostos químicos, considerando-se o conteúdo de clorofila *a*, carboidrato e proteínas solúveis, aminoácidos totais livres, sais e densidade celular.
- ♦ Em cultivo em garrações de vidro de 08 litros, *Cylindrotheca closterium* foi a espécie que apresentou melhor rendimento, tanto na biomassa produzida como nos teores de carboidrato e proteínas solúveis.
- ♦ Em cultivo em saco de plástico de 20 litros, *Chaetoceros gracilis* foi a microalga que apresentou melhor rendimento, tendo produzido valores significativamente mais elevados na biomassa, proteína solúvel e carboidrato solúvel.

5.2 Perspectivas futuras

Neste trabalho foi determinada a composição química de espécies amplamente utilizadas na aquicultura local, cultivadas tanto para experimento como em larga escala para aplicação comercial. De acordo com os dados obtidos, pode-se deixar como sugestão para futuros trabalhos, a análise da variação da composição química de algas já utilizadas comercialmente, em relação a sua curva de crescimento, para detectar a relação entre a fase de crescimento e a produção das várias substâncias que as compõem. Dados como estes, tornariam cada vez mais próxima a elaboração de uma ração “ideal” para os diversos organismos cultivados, diminuindo a relação custo benefício dos aquicultores.

Segue também como sugestão, que a alimentação de organismos em cativeiro seja feita a partir de uma variação de espécies de microalgas, de acordo com a idade e as necessidades específicas dos organismos a serem comercializados e não como hoje em dia observados nas empresas locais.

Por fim, é essencial que os estudos de cultivo interajam com as indústrias, que são as mais interessadas nestes resultados, uma vez que as pesquisas teriam rápida utilização no mercado respondendo a questões reais e imediatas dos aquicultores.

Além de um contato direto com os interessados pela pesquisa em questão, durante a fase final da realização deste trabalho foram feitos contatos com pesquisadores da Universidade Federal Fluminense, no Rio de Janeiro, com os quais há uma proposta em andamento para que as

pesquisas, por ocasião desta Tese iniciadas, sigam em parceria com aquele laboratório.

5.3 Referências Bibliográficas

Association of Official Analytical Chemists - AOAC, **Official methods of analysis**. 15 ed., Washington, D.C., 556 pp., 1990.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 293 p., 1995.

BECKER, E. W.; VENKATAMARAN, L. V.; KHANUM, P. M. Effects of different methods of processing on the protein efficiency ratio of the green algae *Scenedesmus acutus*. **Nutrition Reports International**, v. 14, p. 305 – 314, 1976.

BENNEMANN, J. R. Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue-green algae. **Enzyme microbial technology**, v. 1, p. 83 – 90, 1980.

BENNEMANN, J. R.; WEISSMAN, J. C. Chemicals from microalgae. In: WISE, D. L. ed. **Bioconversion**. CRC Series in Bioenergy Systems. Boca Raton: CRC Press, Inc., pp. 59 – 70, 1984.

BOROWITZKA, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. ed. **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press. cap. 7, p. 153 – 196, 1988.

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

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **J. Exp. Biol. Ecol.** v 145, p. 79-99, 1991.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151: 315 – 331, 1997.

BROWN, M. R.; MCMCAUSLAND, M. A.; KOWALSKI, K. The nutritional value of four Australian microalgal starins fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. **Aquaculture**, v. 165, p. 281 – 293, 1998.

BROWN, M. R.; ROBERT, R. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 297, p. 289 – 309, 2002.

CAERS, M.; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. **Aquaculture**, v. 179, p. 307 - 322, 1999.

CHU, F. L. E.; DUPUY, J. L.; WEBB, K. L. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. **Aquaculture**, v. 29, n. 3/4, p. 241 - 252, 1982.

COHEN, Z. *Prophyridium cruentum*. In: COHEN, Z. (Ed.) **Chemicals from microalgae**. USA: Taylor & Francis. cap. 1, p. 1 – 24, 1999.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; ABALDE, J.; CABEZAS, B. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. **Aquaculture**, v. 50, p. 1-11, 1985b.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; ABALDE J. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch with high nutrients concentrations. **Aquaculture**, v. 49, p. 231-244, 1985a.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; ABALDE, J. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. **Aquaculture**, v. 53, p. 101 – 113, 1986.

FIDALGO J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*, **Aquaculture**, v. 166, p. 105 – 116, 1998.

HEUSSLER, p. Aspects of sloped algae pon engineering. **Archiv für Hydrobiologie, Beihefte Ergebnisse der Limnologie**, v. 20, p. 71 – 84, 1985

KOENING, M. L.; MAIA, P. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. **Revista biológica brasileira**, v. 2, n. 1, p. 23 - 38, 1990.

LEWIN, R. A. Extracelullar polysaccharides of green algae. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 2, p. 665 – 672, 1956.

LOPES-MUÑOZ, I.; ABALDE, J.; HERERRO, C. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com

diferentes temperaturas e intensidades de luz. **Nova acta científica compostelana**, v. 3, 59 – 65, 1992.

LOURENÇO S. O., MARQUEZ U. M. L., MANCINI-FILHO J., AIDAR E., BARBARINO E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors, **Journal of Phycology**, v.34, p. 798 – 811, 1998.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U. M. L.; MANCINI-FILHO, J.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparision of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, p. 153 - 158, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journ. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265 - 275, 1951.

MOORE, B. G.; TISCHER, R. G. Extracelullar polysaccharides of algae: effects on life-support systems. **Science**, v. 145, p. 586 – 587, 1964.

MOURA JUNIOR, A. M.; NETO, E. B.; KOENING, M. L., ESKINAZE LEÇA, E. Chemical compostion of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis gracilis* cultivated different phases of culture. In: PLANKTON SYMPOSIUM, 1. **Abstracts...**, Espinho – Portugal, p. 64, 2001.

NELSON J.R., GUARDA S., COWELL L.E., HEFFERNAN P.B. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30°C, **Aquaculture**, v. 106, p. 357 – 377, 1992.

RENAUD, S. M.; THINH, L.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**, v. 170, p. 147 - 159, 1999.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J. (Ed.) **Micro-algal biotechnology**. Sydney: Cambridge Univsersity Press. cap. 04, 477 p., 1988.

SAUODI-HELIS, L.; DUBACQ, J. P.; MARTY, Y. SAMAIN, J. F. GUDIN C. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T. isso. **Journal applied to phycology**, v. 6, 315 – 322, 1999.

SIPAÚBA TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para a alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: RIMA, 106 p., 2001.

SOEDER, C. J.; HEGEWALD, E. *Scenedesmus*. In: Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J. (Ed.) **Micro-algal biotechnology**. Sydney: Cambridge University Press. cap. 03, 477 p., 1988.

SPECVOROVA, L. V.; GORONKOVA, O. I.; NOSOVA, L. P.; ALBITSKAYA, O.N. High density culture of marine microalgae – promising items for mariculture I. Mineral feeding regime and installations for culturing *Dunaliella tertiolecta* Butch. **Aquaculture**, v. 26, p. 289 – 302, 1982.

THOMAS W. H.; SEIBERT, D. L. R.; ALDEN, M.; NEORI, A.; ELDRIDGE, P. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments. **Biomass**, v. 5, p. 211 – 225, 1984.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, 207 – 216, 2002.

WEBB, K. L.; CHU, F.E. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: Pruder, G. D. Langdon, C., Conklin, D. (Ed.) Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. **Proceedings of the second International conference on Aquaculture Nutrition**, Louisiana State University, L.A., pp. 272 – 291, 1983.

WEISSMAN, J. C.; BENNEMANN, J. R. Polysaccharide production by microalgae. Phase I. **Final Report to National Science Foundation**, NSF/RA-800567, 1980.

YAMASHITA C., MAGALHÃES P. M. S. Meios de Cultura para a Alga *Chaetoceros gracilis*. **Boletim de Pesquisa n. 7**, EMPARN, Rio Grande do Norte, 1984, 18 p.

ANEXOS

ANEXO 01. Instruções aos autores (novo formato de hoehnea) (a partir do vol. 29, 2002).

1. Hoehnea publica artigos originais, revisões e notas científicas em todas as áreas da Botânica e da Micologia (anatomia, biologia celular, biologia molecular, bioquímica, ecologia, filogenia, fisiologia, genética, morfologia, palinologia, taxonomia), em português, espanhol ou inglês. Trabalhos de revisão são aceitos, excepcionalmente, a critério do Corpo Editorial, não devendo se restringir a compilações bibliográficas, mas conter análise crítica. As notas científicas devem apresentar avanços técnicos ou científicos relevantes.

2. O artigo deve conter as informações estritamente necessárias para sua compreensão e estar rigorosamente dentro das normas da revista. Deve ser submetido em três vias impressas (original e duas cópias) para:
Revista Hoehnea

Editor Responsável

Instituto de Botânica

Caixa Postal 4005

01061-970 - São Paulo, SP, Brasil

3. Uma vez aceito para publicação, a versão final deve ser encaminhada em duas vias impressas e em disquete, gravado em "Rich Text Format" (.rtf). Serão fornecidas, gratuitamente, 25 separatas por trabalho publicado.

4. Preparo do original: usar papel branco tamanho A4, com margens de 2 cm,

fonte Times New Roman, tamanho 12; digitar em espaço duplo, alinhar pela margem esquerda, sem justificação. As páginas devem ser numeradas, evitando notas de rodapé. Não ultrapassar 100 laudas digitadas, incluindo tabelas e figuras. Notas científicas devem se limitar a três laudas. Primeira página: deve conter o título do artigo em letras maiúsculas, nome(s)

do(s) autor(es) por extenso (com as iniciais maiúsculas e demais minúsculas);

nome da instituição, endereço completo do(s) autor(es) e endereço eletrônico do autor para correspondência devem ser colocados logo abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), indicados por numerais sobrescritos; colocar abaixo o título resumido.

Segunda página: deve conter ABSTRACT e RESUMO (ou RESUMEN), iniciando com o título na língua correspondente, entre parênteses, em parágrafo único e sem tabulação, com até 150 palavras. Key words e palavras-chave (ou palabras clave), até quatro, separadas por vírgulas e sem ponto final.

Texto: iniciar em nova página. Os títulos de capítulos devem ser escritos em letras maiúsculas, com os seguintes tópicos, quando aplicáveis: INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, CONCLUSÃO, AGRADECIMENTOS e LITERATURA CITADA.

Citação de figuras e tabelas: devem ser referidas por extenso, numeradas em arábico e na ordem em que aparecem no texto; quando citadas entre parênteses, serão empregadas as abreviaturas "fig." e "tab." Em trabalhos de taxonomia, a citação de figuras dos táxons devem ser indicadas entre parênteses, na linha abaixo do táxon, como no exemplo: *Cordia sellowiana* Cham., *Linnaea* 4: 479. 1829. (Fig. 7-8).
Citação de literatura: usar o sistema autor-data, apenas com as iniciais em maiúsculas; quando no mesmo conjunto de citações, seguir a ordem cronológica; quando dois autores, ligar os sobrenomes por &; quando mais de dois autores, mencionar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al. Para trabalhos publicados no mesmo ano, por um autor ou pela mesma combinação de autores, usar letras logo após o ano de publicação (1994a, b, etc.); citar referências a resultados não publicados da seguinte forma: (M. Capelari, dados não publicados).

Nomes científicos: devem ser grafados em itálico; Siglas e abreviaturas: quando citadas pela primeira vez, devem estar entre parênteses e também designadas por extenso.

Unidades de medida: utilizar abreviaturas sempre que possível; nas unidades

compostas, utilizar pontos e não barras para indicar divisão (ex.: mg dia⁻¹ ao invés de mg/dia, µg L⁻¹ ao invés de µg/L); colocar coordenadas geográficas sem espaçamento entre os números (ex.: 23o46'S e 46o18'W).

Literatura citada: seguir a ordem alfabética dos autores; para o mesmo autor

ou mesma combinação de autores, seguir a ordem cronológica; citar títulos de periódicos por extenso; não citar resumos de congressos e artigos no prelo. Seguir os exemplos:

Benjamin, L. 1847. Utriculariae. In: C.F.P. Martius (ed.). Flora Brasiliensis. Typographia Regia, Monachii, v.10, pp. 229-256, t. 20-22.

Cronquist, A. 1988. An integrated system of classification of flowering plants. New York Botanical Garden, New York, 1262 p.

Ettl, H. 1983. Chlorophyta, I. Phytomonadina. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasser Flora von Mitteleuropa, Band 9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 809 p.

Giannotti, E. & Leitão Filho, H.F. 1992. Composição florística do cerrado da Estação Experimental de Itirapina (SP). In: R. R. Sharif (ed.). Anais do 8o Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Campinas, pp. 21-25.

Heywood, V.H. 1971. The Leguminosae - a systematic review. In: J.B. Harbone, D. Boulter, & B.L. Turner (eds.). Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, London, pp. 1-29.

Trufem, S.F.B. 1988. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 358 p.

Veasey, E.A. & Martins, P.S. 1991. Variability in seed dormancy and germination potencial in *Desmodium* Desv. (Leguminosae). Revista de Genética 14: 527-545.

5. Tabelas: fazer em páginas separadas; iniciar por: "Tabela" e numeração em arábico, na ordem em que aparece no texto (Tabela 1., Tabela 2.), seguidas

por título breve e objetivo. Evitar abreviaturas (exceto para unidades) mas, se inevitável, acrescentar seu significado na legenda. Utilizar recursos de criação e formatação de tabela do "Word for Windows" ou "Excel". Não inserir linhas verticais; usar linhas horizontais apenas para destacar o cabeçalho e para fechar a tabela. Em tabelas que ocupem mais de uma página,

acrescentar na(s) página(s) seguinte(s), no canto superior esquerdo, "Tabela 1. (cont.)", repetindo o cabeçalho, mas não o título.

6. Figuras: colocar cada figura ou conjunto de figuras em página separada; as legendas devem ser listadas à parte e em seqüência. Cada figura (foto, desenho, gráfico, mapa ou esquema) deve ser numerada em arábico, na ordem

em que aparece no texto; letras minúsculas podem ser usadas para subdividir

figuras; a colocação do número na figura deve ser, sempre que possível, no canto inferior direito. O comprimento máximo para uma figura ou grupo de figuras é de 230 mm, incluindo a legenda, podendo ajustar-se à largura de uma ou de duas colunas (81 mm ou 172 mm) e ser proporcional (até duas vezes) à área final da ocupação da figura. Desenhos devem ser originais, feitos em tinta nanquim preta, sobre papel branco de boa qualidade ou vegetal; linhas e letras devem estar nítidas o suficiente para permitir redução.

Fotografias e gráficos são aceitos em branco e preto e, quando coloridos, devem ser custeados pelo autor. A escala adotada é a métrica, devendo estar graficamente representada no lado esquerdo da figura. Figuras com baixa qualidade gráfica ou fora das proporções, não são aceitas. Em caso de dúvidas para elaboração do manuscrito, consultar o Corpo Editorial: hoehnea@smtp-gw.ibot.sp.gov.br.

Novo formato para HOEHNEA original Hoehnea atual

Novo formato de Hoehnea

33 laudas

22 páginas 11 páginas

100 laudas

_ 33 páginas

Área útil:

185 mm X 125 mm

Cada coluna: 81 mm x 230 mm

(10mm, espaço entre colunas)

Duas colunas: 172 mm x 230 mm

Tabelas e figuras –

Comprimento máximo: até 230 mm

Larguras permitidas: uma coluna (81 mm) ou duas colunas (172 mm)

Chaves Taxonômicas – poderão ter a largura de uma ou duas colunas,
Dependendo da extensão

Abstract e Resumo – largura de duas colunas

ANEXO 02. Normas da revista *Acta Oecologica*.

The aims and scope of *Acta Oecologica* are presented at the front of this issue.

The text should be written in English.

There are no page charges.

Manuscripts should be sent to: Chiara Marchetti, NIOO-CTO, P.O. Box 40, 6666 ZG Heteren, the Netherlands. The original and three copies are required, each accompanied by figures and tables. Authors are invited to suggest the names of potential referees.

Manuscript preparation

Manuscripts should be typed, double spaced, on one side only, with a 5 cm margin.

The title page should contain the full title, a short running title, author's name(s), affiliation address(es), address for correspondence, fax number, e-mail.

Full papers

Articles should be divided into the following sequence sections: title page, abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements, references, tables, legends of figures and figures.

An abstract not exceeding 250 words is required for articles. The abstract should indicate the main results and conclusions.

Methods should be explained in sufficient detail to permit replication.

Forum

The Forum section is reserved for short papers containing critical discussion of current issues in ecology, and welcomes comments and viewpoints on previously published papers

Units

Use the form: $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Use standard international units (SI).

References

Journal titles should be abbreviated according to the list of serial title word abbreviations (standard ISO) published by the ISSN International Centre, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France.

References cited should be listed in alphabetical order, and this reference list is numbered in ascending order.

The numbering shall be used when citing references in the text. List numbers in numerical order in square brackets.

The following models for the reference list cover all situations. The punctuation must be followed exactly.

[1] Begon M., Harper J., Towsend C., Ecology. Individuals, Populations and Communities, Blackwell Scientific Publications, London, 1990, 945 p.

[2] Grant B., Dunham A., Thermally imposed time constraints on the activity of the desert lizard *Sceloporus meriami*, Ecology 69 (1988) 167-176.

[3] Petal J., The role of ants in ecosystems, in: Brian M.V. (Ed.), Production Ecology of Ants and Termites, IBP 13, Cambridge University Press, Cambridge, 1978, pp. 293-325.

Tables and figures

In the text, write: *figure 1, table IV*, etc.

Tables should be numbered with roman numerals, each on a separate sheet, and contain only horizontal rules. All tables should have complete but brief headings.

Figure legends should be typed on a separate sheet. All illustrations are to be considered as figures and numbered consecutively throughout the text. Adopt preferably a width to allow 1/2 or 1/4 reduction (final size 8 or 16 cm wide).

If photographs are included, three sets of originals are required with high contrast on glossy paper. Colour illustrations carry an extracharge.

Acceptance of papers

After revision and final acceptance, the manuscript should preferably be provided on a high density (HD) disk labelled with: the type of computer used in MS-DOS or format Mac Intosh, the type of software and version number, all file names and author's name(s). The corresponding printed version should be supplied. Once your text is typed, save as an RTF (Rich Text Format) file. If figures are sent on digital files, it is essential that they are saved in *their original format* (preferably TIFF, 300 dpi.)

Page proofs

Page proofs will be sent to the first author and should be returned to the Editor within 48 hours of receipt. Alterations in the text, other than corrections, may have to be charged to the author and could seriously delay publication.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper and one copy of the journal issue will be provided free of charge. Additional offprints may be purchased. Send an order form with the proofs.

For permission to reproduce material from *Acta Oecologica*, please apply to the Publisher.

On acceptance, papers become the copyright of the journal.

ANEXO 03. Posição taxonômica das microalgas estudadas.

Divisão Heterokontophyta

Classe Bacillariophyceae

Ordem Biddulphiales

SubOrdem Coscinodiscineae

Família Thalassiosiraceae

Gênero *Thalassiosira**Thalassiosira weissflogii*

(Grunow) G. Fryxell & Hasle

SubOrdem Biddulphiineae

Família Chaetocerotaceae

Gênero *Chaetoceros**Chaetoceros gracilis* Schütt

Ordem Bacillariales

SubOrdem Bacillariineae

Família Bacillariaceae

Gênero *Cylindrotheca**Cylindrotheca closterium*

(Ehrenberg) Eimann & Lewin

Divisão Haptophyta

Classe Haptophyceae

Ordem Isochysidales

Família Isochrysidaceae

Gênero *Isochrysis**Isochrysis galbana* Parke

Divisão Chlorophyta

Classe Prasinophyceae

Ordem Chlorodendrales

SubOrdem Chlorodendraceae

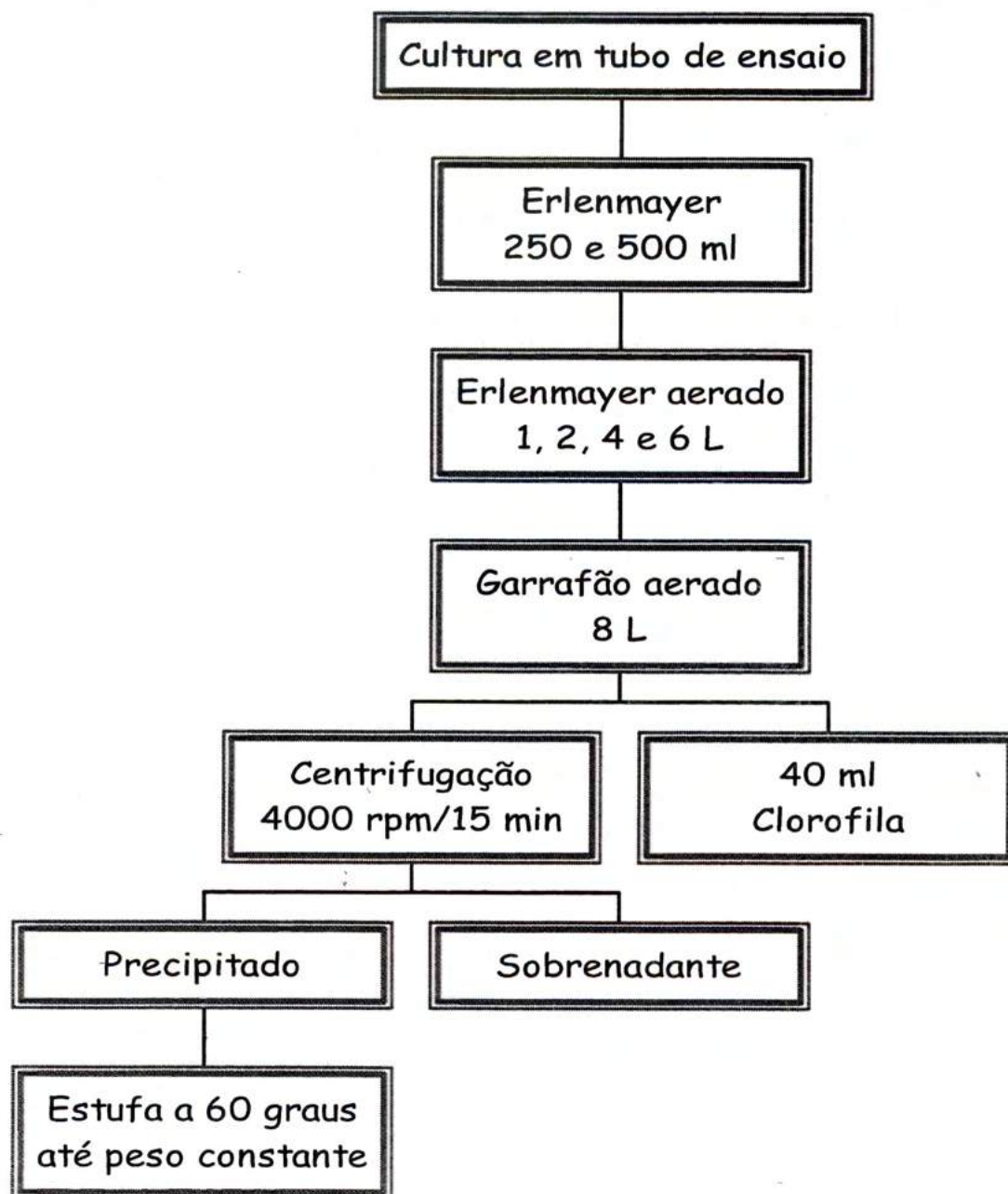
Família Tetraselmis

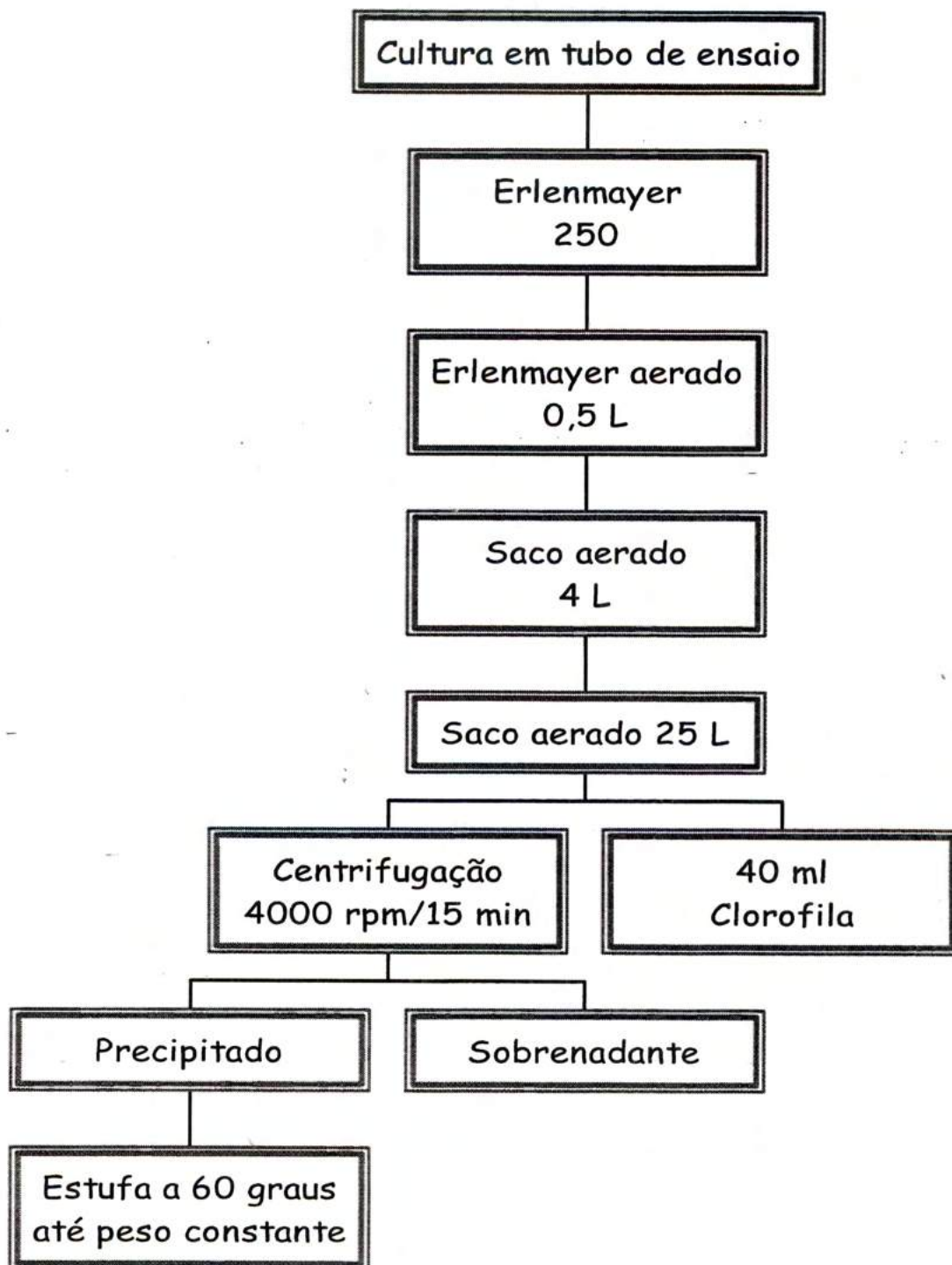
Gênero *Tetraselmis**Tetraselmis gracilis* (Kylin)

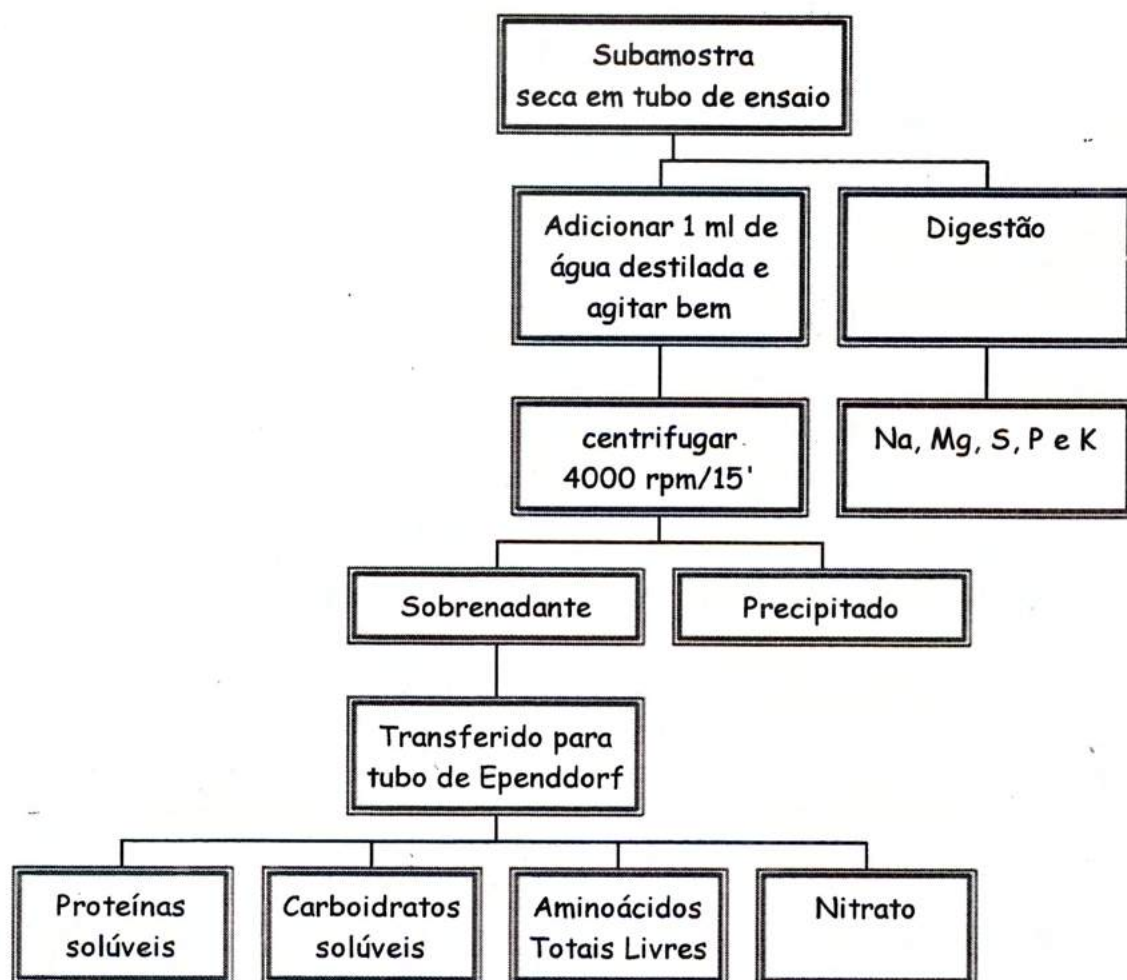
Butcher

ANEXO 04. Composição química dos meio f/2-Guillard (Guillard, 1975).

f/2 - Guillard	
Substâncias	Quant./Litro
NaNO ₃	75mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5mg
Na ₂ SiO ₃ .9 H ₂ O	15-30mg
Na ₂ EDTA	4,36mg
FeCl ₃ .6 H ₂ O	3,15mg
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,01mg
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,022mg
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,01mg
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,18mg
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,006mg
Tiamina	0,1mg
Biotina	0,5mg
Vitamina B ₁₂	0,5mg
Água do mar	1 litro

ANEXO 05. Esquema de obtenção do extrato seco a partir do cultivo de microalga em garrafão de vidro.

ANEXO 06. Esquema de obtenção do extrato seco a partir do cultivo de microalga em saco de plástico.

ANEXO 07. Esquema para preparação dos extratos para as análises bioquímicas de microalgas.

ANEXO 08. Densidade celular ($\times 10^6$ cel. L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2.500	2.400	2.448,75	2.450	70,71
<i>Isochrysis galbana</i>	3.328	3.261	3.293	3.295	47,73
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	2.075	1.692	2.017	2.018	79,55

ANEXO 09. Análise de variância da densidade celular de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	285106.22	1425603.11	92.4969	0.00020
Resíduo	6	92474.66	14512.44		
Total	8	2943680.88			

ANEXO 10. Teores de clorofila *a* (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	I	II	Média	D.P.
<i>Chaetoceros gracilis</i>	3,93	3,56	3,74	0,26
<i>Isochrysis galbana</i>	1,93	1,81	1,87	0,08
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,90	1,01	0,96	0,08

ANEXO 11. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	8.091298	4.0456490	148.5509	0.00103
Resíduo	3	0.0817023	0.0272341		
Total	5	8.1730002			

ANEXO 12. Teores de carboidrato solúvel ($\text{mg} \times \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	
<i>Isochrysis galbana</i>	0,09	0,09	0,09	0,09	
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,05	0,05	...	0,05	

... – não de terminado.

ANEXO 13. Análise de variância dos teores de carboidrato solúvel de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0022875	0.011438	12792627	0.00002
Resíduo	5	0.0000000	0.000000		
Total	7	0.0022875			

ANEXO 14. Teores de proteína solúvel ($\text{mg} \times \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,026	0,040	0,026	0,03	0,01
<i>Isochrysis galbana</i>	0,004	0,011	...	0,008	0,005
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,002	0,002	0,002	0,002	

... – não de terminado.

ANEXO 15. Análise de variância dos teores proteína solúvel de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0013497	0.0006749	21.7461	0.00446
Resíduo	5	0.0001552	0.0000310		
Total	7	0.0015049			

ANEXO 16. Teores de aminoácidos totais (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2,55	3,16	2,89	2,87	0,31
<i>Isochrysis galbana</i>	,,,	1,73	1,83	1,78	0,07
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	3,13	3,27	,,,	3,54	0,6

Nota: ... – dado não determinado

ANEXO 17. Análise de variância dos teores de aminoácidos totais de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	2.2596200	1.1298100	22.4096	0.00858
Resíduo	4	0.2016658	0.0504164		
Total	6	2.4612858			

ANEXO 18. Teores de nitrato (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,06	0,07	0,03	0,05	0,02
<i>Isochrysis galbana</i>	0,17	0,14	...	0,15	0,09
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,04	0,02	0,04	0,03	0,01

Nota: ... – dado não determinado

ANEXO 19. Análise de variância dos teores de nitrato de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0193042	0.0096521	30.4803	0.00249
Resíduo	5	0.0015833	0.0003167		
Total	7	0.0208875			

ANEXO 20. Teores de Na (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	5,18	5,18	5,18	5,18	
<i>Isochrysis galbana</i>	3,75	3,75	3,75	3,75	
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	6,59	6,59	6,59	6,59	

ANEXO 21. Análise de variância dos teores de sódio de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	12.0985964	6.0492982	7347277	0.00001
Resíduo	6	0.0000049	0.0000008		
Total	8	12.0986013			

ANEXO 22. Teores de K (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,55	0,55	0,55	0,55	
<i>Isochrysis galbana</i>	0,52	0,52	0,52	0,52	
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,91	0,91	0,91	0,91	

ANEXO 23. Análise de variância dos teores de potássio de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.2826000	0.1413000	19755172	0.00001
Resíduo	6	0.0000000	0.0000000		
Total	8	0.2826000			

ANEXO 24. Teores de P (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições		Média	D.P.
	I	II		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,13	0,13	0,13	
<i>Isochrysis galbana</i>	0,21	0,21	0,21	
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,12	0,13	0,12	0,001

ANEXO 25. Análise de variância dos teores de fósforo de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0091000	0.0045500	273.0103	0.00049
Resíduo	3	0.0000500	0.0000167		
Total	5	0.0091500			

ANEXO 26. Teores de Mg (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições		Média	D.P.
	I	II		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2,20	2,10	2,13	0,10
<i>Isochrysis galbana</i>	2,88	2,92	2,90	0,03
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	2,04	1,94	1,99	0,07

ANEXO 27. Análise de variância dos teores de magnésio de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.9441346	0.4720673	131.1422	0.00121
Resíduo	3	0.0107990	0.0035997		
Total	5	0.9549336			

ANEXO 28. Teores de S (mg x L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

	Repetições		Média	D.P.
	I	II		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,47	0,29	0,38	0,13
<i>Isochrysis galbana</i>	0,63	0,49	0,56	0,10
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,9	0,98	0,94	0,05

ANEXO 29. Análise de variância dos teores de enxofre de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, cultivadas em saco de plástico de 20 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.3269333	0.1634667	16.7945	0.02280
Resíduo	3	0.0292000	0.0097333		
Total	5	0.3561333			

ANEXO 30. Densidade celular ($\times 10^6$ cel· L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	8447,5	8437,5	8440	8442,5	7,07
<i>Tetraselmis gracilis</i>	576,25	548,75	552,25	562,5	19,45

ANEXO 31. Análise de variância da densidade celular ($\times 10^6$ cel· L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	1	93202680	93202680	7421580	0.0001
Resíduo	4	502	125		
Total	5	93203182			

ANEXO 32. Teores de clorofila *a* (mg · L⁻¹) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2,35	3,63	3,86	3,28	0,82
<i>Cylindrotheca closterium</i>	13,56	12,77	14,95	13,76	1,11
<i>Tetraselmis gracilis</i>	6,49	7,16	7,72	7,12	0,61

ANEXO 33. Análise de variância dos teores de clorofila *a* de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	168.6470126	84.3235063	111.9730	0.00016
Resíduo	6	4.5184180	0.7530697		
Total	8	173.1654306			

ANEXO 34. Teores de carboidrato solúvel ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,11	0,09	0,11	0,10	0,009
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,11	0,08	0,09	0,09	0,014
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,07	0,06	0,05	0,06	0,008

ANEXO 35. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0030889	0.0015444	9.9286	0.01307
Resíduo	6	0.0009333	0.0001556		
Total	8	0.0040222			

ANEXO 36. Teores de proteína solúvel ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,60	0,55	0,60	0,58	0,02
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,62	0,67	0,58	0,62	0,04
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,39	0,33	0,42	0,38	0,04

ANEXO 37. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.1021555	0.0510777	30.8521	0.00122
Resíduo	6	0.0099334	0.0016556		
Total	8	0.1120889			

ANEXO 38. Teores de aminoácidos totais ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	13,36	16,71	15,68	15,25	1,40
<i>Cylindrotheca closterium</i>	24,02	24,75	22,70	23,82	0,84
<i>Tetraselmis gracilis</i>	1,37	1,61	...	1,49	0,12

... – não determinado

ANEXO 39. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	598.776383	299.3881915	185.3422	0.00024
Resíduo	5	8.0766349	1.6153270		
Total	7	606.8530179			

ANEXO 40. Teores de nitrato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,14	0,17	0,08	0,130	0,04
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,34	0,39	...	0,365	0,025
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,09	0,07	...	0,080	0,01

... – não determinado

ANEXO 41. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0958929	0.0479464	33.9445	0.00478
Resíduo	4	0.0056500	0.0014125		
Total	6	0.1015429			

ANEXO 42. Teores de sódio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,07	0,07	...	0,07	...
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,05	0,05	0,04	0,46	0,047
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0

... – não determinado

ANEXO 43. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0012762	0.0006381	38.2856	0.00407
Resíduo	4	0.0000667	0.0000167	-	
Total	6	0.0013429			

ANEXO 44. Teores de potássio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,02	0,02	...	0,02	...
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,008	0,008	0,009	0,008	0

... – não determinado

ANEXO 45. Análise de variância dos teores de nas espécies *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0002333	0.0001167	700.0010	0.00034
Resíduo	4	0.0000007	0.0000002		
Total	6	0.0002340			

ANEXO 46. Teores de fósforo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2,12	2,09	2,07	2,09	0,02
<i>Cylindrotheca closterium</i>	3,22	2,89	2,31	2,80	0,38
<i>Tetraselmis gracilis</i>	1,19	0,86	0,81	0,95	0,16

ANEXO 47. Análise de variância dos teores de fósforo de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	5.2432889	2.6216445	30.7825	0.00122
Resíduo	6	0.5110000	0.0851667		
Total	8	5.7542889			

ANEXO 48. Teores de Magnésio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	14,87	14,82	14,67	14,78	0,085
<i>Cylindrotheca closterium</i>	4,90	5,05	4,98	4,97	0,06
<i>Tetraselmis gracilis</i>	7,24	7,07	6,54	6,95	0,30

ANEXO 49. Análise de variância dos teores de magnésio de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	3690856	1845428	0.9914	0.57339
Resíduo	6	11168568	1861428		
Total	8	14859425			

ANEXO 50. Teores de enxofre ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

	Repetições			Média	D.P.
	I	II	III		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,03	0,03	...	0,03	...
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,005

... – não determinado

ANEXO 51. Análise de variância dos teores de enxofre de *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Tetraselmis gracilis*, cultivadas em garrafão de vidro de 08 litros.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Espécies	2	0.0004762	0.0002381	14.2857	0.01692
Resíduo	4	0.0000667	0.0000167		
Total	6	0.0005429			