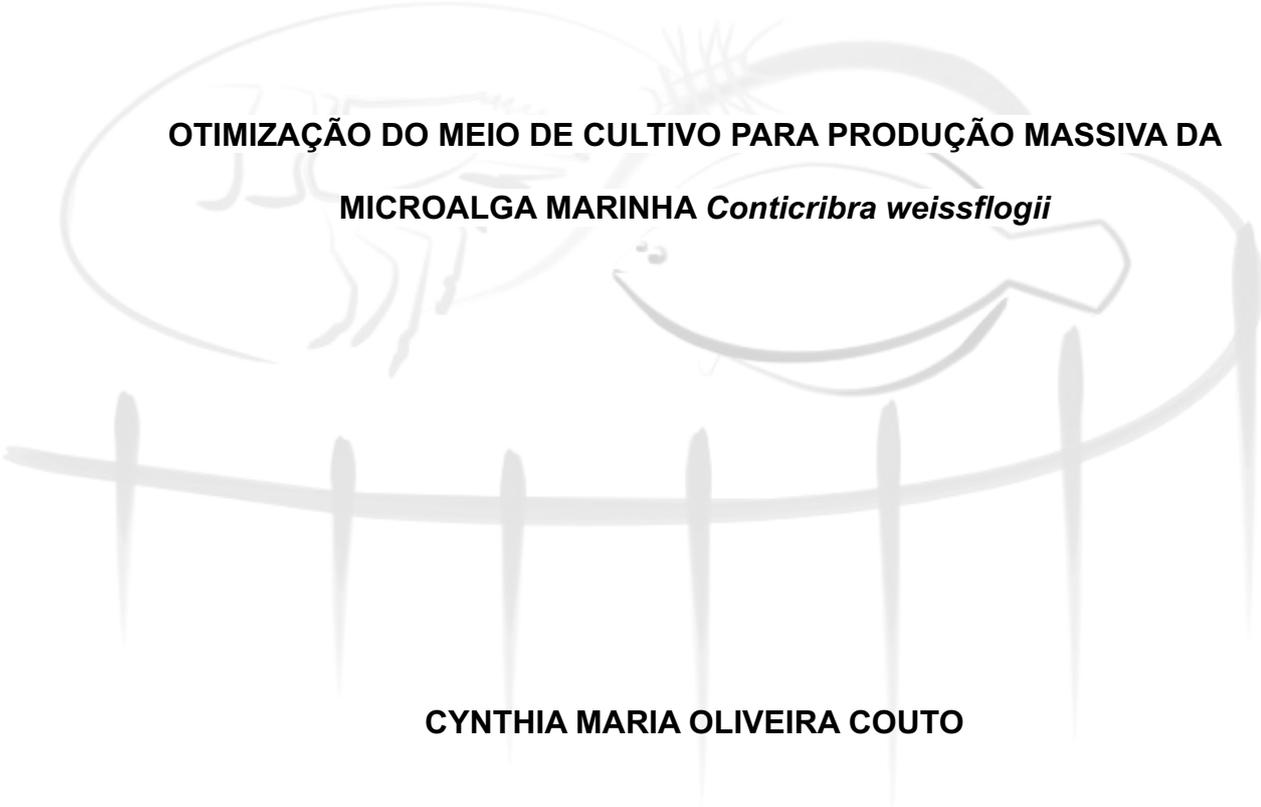




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO MASSIVA DA
MICROALGA MARINHA *Conticribra weissflogii*

CYNTHIA MARIA OLIVEIRA COUTO

RIO GRANDE - RS

Fevereiro de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO MASSIVA DA
MICROALGA MARINHA *Conticribra weissflogii*

Cynthia Maria Oliveira Couto

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Abreu

Co-Orientador: Dr. Fabio Roselet

RIO GRANDE - RS

Fevereiro de 2020

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	4
1.1. Microalgas.....	4
1.2. Importância e aplicações das microalgas	4
1.3. <i>Conticribra weissflogii</i>	5
1.4. Meio de Cultura.....	7
1.5. Planejamento experimental	7
2. OBJETIVO	8
2.1. Objetivo geral.....	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. REFERÊNCIAS.....	9
Capítulo 1.....	13
Resumo.....	14
1. Introdução	15
2. Materiais e métodos.....	16
2.1. Cultivo da microalga	16
2.2. Fonte de nitrogênio	17
2.3. Otimização do meio de cultivo	18
2.3.1. Varredura dos nutrientes significativos	18

2.3.2. Otimização dos nutrientes importantes.....	20
2.3.3. Otimização da relação de custo-benefício.....	21
2.4. Comparação do custo dos meios	22
2.5. Análise da biomassa.....	23
2.5.1. Análise de Proteínas.....	23
2.5.2. Lipídios e perfil de ácidos graxos.....	23
2.6. Análise estatística	24
3. Resultados	24
3.1. Determinação da fonte de nitrogênio.....	24
3.2. Otimização do meio de cultivo	25
3.2.1. Varredura dos nutrientes significativos	25
3.2.2. Otimização dos fatores significativos.....	27
3.3. Otimização da relação de custo-benefício.....	31
3.4. Comparação do custo dos meios	32
3.5. Análise da biomassa.....	33
4. Discussão	35
4.1. Determinação da fonte de nitrogênio.....	35
4.2. Otimização do meio de cultivo	36
4.2.1. Varredura dos nutrientes essenciais.....	36
4.2.2. Otimização dos fatores significativos.....	37
4.3. Otimização da relação custo-benefício.....	38
4.4. Análise da biomassa.....	39
4.4.1. Proteínas.....	39
4.4.2. Lipídios e perfil de ácidos graxos.....	40

5. Conclusões	41
Agradecimentos	42
Referências	42
CONCLUSÕES GERAIS	48
PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS	49

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar.

Aos meus pais, Simone e Cosé, que sempre apoiaram e respeitaram as minhas escolhas, obrigada por todo o amor e suporte.

Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos e a minha segunda família, que apesar da distância, sempre estiveram presentes nos meus pensamentos e orações.

A CAPES, pelo financiamento prestado, que contribuiu muito para a realização desta dissertação.

Ao meu orientador Paulo Abreu, ao qual sou extremamente grata, por todos os ensinamentos que melhoraram tanto esse trabalho, mas principalmente pela compreensão e paciência.

Ao meu co-orientador Fabio que foi muito importante na realização deste estudo. Muito obrigada pela paciência e pelos conselhos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da FURG, obrigada pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula.

A professora Janaína, pelas aulas de planejamento experimental e por sempre dispor de um tempinho para tirar minhas dúvidas.

Ao pessoal dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos (LTA), Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) e de Ecologia do Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos pelo suporte para realizar as análises, em especial aos professores Rui e Rafael.

Aos companheiros de laboratório e de EMA, vocês foram muito importantes nessa jornada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios testados, todos com 12,36 mg/L de nitrogênio. Y = meio Yamashita & Magalhães, YU = meio com ureia, YA = meio com amônia, F/2 = controle.	17
Tabela 2. Fatores e níveis do primeiro experimento de varredura. Valores dos níveis expressos em mg/L.....	19
Tabela 3. Fatores e níveis do segundo experimento de varredura. Valores dos níveis expressos em mg/L. Entre parênteses informa-se o nível de cada fator no primeiro planejamento Plackett & Burman.....	20
Tabela 4. Fatores e níveis utilizados no DCCR 2 ⁴ . Valores dos níveis expressos em mg/L.	21
Tabela 5. Tabela de regressão com efeitos principais do primeiro experimento de varredura (PB12).	27
Tabela 6. Tabela de regressão com os efeitos principais do segundo experimento de varredura (PB12).	27
Tabela 7. Tabela de regressão com os efeitos e interações do experimento de otimização (DCCR). X ₁ = ureia, X ₂ = superfosfato de cálcio, X ₄ = metassilicato de sódio e X ₆ = biotina.....	28
Tabela 8. ANOVA da resposta densidade celular.....	29
Tabela 9. Valores codificados, resultados observados do DCCR e desvio em relação aos resultados preditos pelo modelo polinomial quadrático. X ₁ = ureia, X ₂ = superfosfato de cálcio, X ₄ = metassilicato de sódio e X ₆ = biotina.	30
Tabela 10. Custos para produzir 1000 L de cultivo e 1 kg de biomassa seca e redução dos custos pela substituição do F/2 pelos meios alternativos.	33
Tabela 11. Composição de ácidos graxos de <i>Conticribra weissflogii</i> nos tratamentos YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado para custo/benefício e F/2 = controle (AGS – Ácidos graxos saturados, AGI – Ácidos graxos insaturados e AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados).	35

Tabela 12. Balanço de massa entre a concentração de nitrogênio disponibilizada e a assimilada nos tratamentos YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado para custo benefício e F/2 = controle. 38

Tabela 13. Número atômico dos elementos em cada meio ($\times 10^{20}$), suas concentrações entre parênteses (mg/L) e razão atômica entre N, P e Si nos meios YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado para custo/benefício e F/2 = controle..... 40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Médias e desvio padrão da densidade celular de *C. weissflogii* em diferentes fontes de nitrogênio. Y = meio Yamashita & Magalhães, YU = meio com ureia, YA = meio com amônia, F/2 = controle. Todos os meios possuem 12,36 mg/L de nitrogênio.25
- Figura 2: Curvas de contorno para a resposta densidade celular em função das variáveis estudadas: a) Ureia × silicato; b) Superfosfato × silicato; c) Ureia × biotina; d) Silicato × biotina. Os círculos pretos representam a melhor combinação para obter a maior densidade celular, e os círculos brancos representam a melhor combinação para obter a melhor relação de custo-benefício.31
- Figura 3: Perfil de desejabilidade para otimização da relação de custo-benefício do meio otimizado para *C. weissflogii*.....32
- Figura 4: Análise da biomassa. a) Peso seco em mg/L. b) Percentual de proteínas e c) Percentual de lipídios. YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado pra custo benefício e F/2 = controle.34

1 RESUMO GERAL

2 As microalgas são consideradas uma fonte potencialmente rica de diversos
3 componentes de interesse comercial. No entanto, a viabilidade de sua produção
4 depende de vários fatores, dentre eles, os custos dos meios de cultivo. Por esse
5 motivo, existe uma grande necessidade de se desenvolver meios com menor custo,
6 mas eficientes. São poucos os estudos que testaram a substituição de meios de
7 cultura laboratoriais, com compostos com alto grau de pureza, por elementos menos
8 puros e mais econômicos, como fertilizantes. O objetivo deste estudo foi desenvolver
9 um meio de cultivo de baixo custo para a produção massiva da microalga *Conticribra*
10 (*Thalassiosira weissflogii*) e avaliar a quantidade e composição bioquímica da
11 biomassa produzida. Para isso, primeiramente foi avaliada qual fonte de nitrogênio
12 (amônia ou ureia) é a mais apropriada para o crescimento da espécie. Posteriormente,
13 através da metodologia de planejamento experimental, foram avaliados quais
14 elementos do meio de cultivo são essenciais para crescimento da espécie e, em
15 seguida, as suas concentrações foram otimizadas. Uma segunda otimização foi
16 realizada ajustando as concentrações dos elementos para uma melhor relação
17 custo/benefício do novo meio formulado. Além disso, foi feita a validação experimental
18 do modelo empírico obtido. Por fim foram feitas análises de proteínas, lipídios e perfil
19 de ácidos graxos da biomassa nos meios *F/2* (laboratorial), Yamashita e Magalhães
20 (1984) com Ureia (YU), Otimizado para Crescimento (YC) e Otimizado para
21 Custo/Benefício (YCB). Vimos que a microalga teve melhor crescimento com ureia
22 como fonte de nitrogênio. O meio de cultivo foi otimizado, tanto para o crescimento
23 quanto para o melhor custo/benefício, e a validação experimental demonstrou que o
24 modelo empírico foi preditivo. A análise de custo mostrou que o meio YCB representou
25 uma redução de 79,4% no custo do meio, em comparação com o meio *F/2*. A biomassa

- 26 produzida no meio YCB teve maior percentual de proteínas e lipídios, mas não
- 27 apresentou diferenças no perfil de ácidos graxos em comparação aos outros meios.

28 **ABSTRACT**

29 Microalgae are a potentially rich source of several components of commercial interest.
30 However, the viability of their production depends on several factors, among them, the
31 costs of the means of cultivation. For this reason, there is a great need to develop less
32 costly, but efficient means. Few studies have tested the replacement of laboratory
33 culture media, with compounds with a high degree of purity, by less pure and more
34 economical elements such as fertilizers. The objective of this study was to develop a
35 low-cost cultivation medium for the mass production of the microalgae *Conticribra*
36 (*Thalassiosira weissflogii*) and to evaluate the quantity and composition of the biomass
37 produced. For that, it was first evaluated which nitrogen source (ammonia or urea) is
38 the most appropriate for the growth of the species. Subsequently, through the design
39 of experiments methodology, which elements of the culture medium are essential for
40 the growth of the species were evaluated and then their concentrations were
41 optimized. A second optimization was carried out by adjusting the concentrations of
42 the elements for a better cost/benefit ratio of the new formulated medium. In addition,
43 an experimental validation of the empirical model was performed. Finally, analyzes of
44 proteins, lipids and fatty acid profiles of the biomass were performed in the F/2
45 (laboratory), Yamashita and Magalhães (1984) media with Urea (YU), Optimized for
46 Growth (YC) and Optimized for Cost/Benefit (YCB). We saw that the microalgae had
47 better growth with urea as a nitrogen source. The culture medium was optimized, both
48 for growth and for the best cost/benefit, and the experimental validation demonstrated
49 that the empirical model was predictive. The cost analysis showed that the YCB
50 medium represented a 79.4% reduction in the cost of the medium, compared to the
51 F/2 medium. The biomass produced in the YCB medium had a higher percentage of
52 proteins and lipids but did not show differences in the fatty acid profile compared to
53 other media.

54 **1. INTRODUÇÃO GERAL**

55 **1.1. Microalgas**

56 O termo microalga não apresenta valor taxonômico, mas designa seres unicelulares
57 microscópicos que apresentam clorofila *a* e realizam fotossíntese para a produção de
58 sua própria matéria orgânica (Edwards, 1997; Raven e Giordano, 2014). Apesar
59 destas similaridades, organismos caracterizados como microalgas são
60 filogeneticamente muito diferentes entre si, apresentando características morfológicas
61 e composição química distintas (Lourenço, 2006). As microalgas podem ser
62 planctônicas, bentônicas ou terrestres. Habitam praticamente todos os ambientes
63 aquáticos existentes, sendo mais abundantes em ambientes marinhos (Riviers, 2006).
64 São os principais responsáveis pela produção primária, sendo a base das cadeias
65 alimentares em ambientes aquáticos (Johnsen, 2012).

66

67 **1.2. Importância e aplicações das microalgas**

68 Há um crescente interesse nas microalgas devido as suas possíveis aplicações
69 comerciais em áreas como nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas
70 residuais e produção de energia, com diferentes usos nas indústrias alimentícias,
71 químicas e farmacêuticas (Raposo et al., 2013).

72 Além de muito ricas em proteínas e lipídio, algumas espécies de microalgas são fontes
73 comerciais estabelecidas de elementos químicos de alto valor, como os pigmentos β -
74 caroteno, astaxantina, ficobilina e os ácidos graxos docosaheptaenóico,
75 eicosapentaenóico (Borowitzka, 2013).

76 Além disto, as microalgas são indispensáveis no cultivo de diversos organismos
77 aquáticos, servindo como fonte de alimento em todos os estágios de crescimento de
78 moluscos bivalves e nos estágios larvais iniciais de algumas espécies de crustáceos

79 e peixes, podendo ainda ser consumida pelo zooplâncton, utilizado como alimento
80 vivo de larvas e juvenis de crustáceos e peixes (Santos-Ballardo et al., 2015).

81

82 **1.3. *Conticribra weissflogii***

83 As diatomáceas são microalgas que possuem clorofilas *a* e *c* e uma frústula silicosa
84 formada por duas valvas, a epivalva (valva maior) e a hipovalva (valva menor). Estas
85 se distribuem amplamente na natureza, habitando meios aquáticos límnicos e
86 marinhos (Riviers, 2006). Sua reprodução se dá essencialmente por multiplicação
87 celular vegetativa, onde a frústula se divide e cada uma das valvas desempenha o
88 papel da epivalva. Ao longo das multiplicações, isso resulta em uma diminuição
89 progressiva no tamanho das células que recebem a hipovalva da célula mãe, por esse
90 motivo, quando as células atingem um dado tamanho mínimo, a reprodução se dá de
91 forma sexuada por meio da formação de um zigoto (Armbrust, 1990).

92 Diatomáceas têm sido consideradas o grupo de microalgas mais importante na
93 alimentação de larvas de camarões marinhos (Sorgeloos, 1996). Em especial a
94 diatomácea *Conticribra weissflogii* (Fig. 1), anteriormente classificada como
95 *Thalassiosira weissflogii*, até que Stachura-Suchoples & Williams (2009)
96 apresentaram evidências morfológicas de registros fósseis e de moléculas desta
97 espécie, que resultou em sua mudança taxonômica para o novo gênero *Conticribra*
98 (Stachura-Suchoples and Williams, 2009).

99



100

101 Figura 1 – *Conticribra weissflogii*. Fonte: [http://nordicmicroalgae.org/taxon/Thalassiosira%20](http://nordicmicroalgae.org/taxon/Thalassiosira%20weissflogii?media_id=Thalassiosira%20weissflogii_4.JPG)
102 [weissflogii?media_id=Thalassiosira%20weissflogii_4.JPG](http://nordicmicroalgae.org/taxon/Thalassiosira%20weissflogii_4.JPG)

103

104 Na aquicultura, a importância de *C. weissflogii* se dá, principalmente, devido as suas
105 altas taxas de crescimento e tolerância a variações de temperatura, luz e nutrientes
106 (Vella et al., 2019), além de apresentar altas taxas de fixação de carbono e uma ótima
107 eficiência fotossintética (Borges et al., 2011). Além disso, esta espécie apresenta alto
108 valor nutricional. Autores relataram menor consumo de ração, conversão alimentar
109 mais eficiente e maior ganho de peso na engorda do camarão-branco *Litopenaeus*
110 *vannamei* produzido em sistema BFT (Biofloc Technology) com a adição da
111 diatomácea *C. weissflogii* (Godoy et al., 2012). Isso também foi observado em viveiros
112 com sistema BFT, evidenciando assim o grande potencial dessa microalga como
113 suplemento alimentar nesse tipo de sistema (Martins et al., 2016).

114 O crescimento das microalgas é resultado de interações biológicas, físicas e químicas
115 que ocorrem entre estas e o ambiente (Derner, 2006). Sendo a luz, pH, turbidez,
116 salinidade, temperatura, a quantidade e qualidade dos nutrientes presentes no meio
117 os principais fatores físicos e químicos a serem considerados (Sorgeloos, 1996). Para
118 *C. weissflogii*, a maior taxa de crescimento e melhor composição bioquímica se dá em
119 salinidades entre 25 e 30 (Garcia et al., 2012). Correlacionando os valores de pH e
120 níveis de Nitrogênio e Fósforo, foi encontrado o maior crescimento da microalga em

121 valores de pH de 7,9 e com os maiores níveis de Nitrogênio e Fósforo no meio de
122 cultura (35,7 e 1,45 mg/L, respectivamente) (Zheng et al., 2016).

123

124 **1.4. Meio de Cultura**

125 Um meio de cultura é definido como um ambiente específico e finito que contém os
126 nutrientes e elementos necessários ao desenvolvimento das microalgas, sendo o seu
127 desenvolvimento também dependente de luz (Lourenço, 2006). Esses nutrientes
128 podem ser divididos em macronutrientes, como o carbono, nitrogênio, fósforo e
129 enxofre, e em micronutrientes, como o sódio, potássio, ferro, magnésio, cálcio e outros
130 metais (Cai et al., 2013). Os macronutrientes são os constituintes estruturais das
131 biomoléculas, já os micronutrientes participam da estrutura e das atividades de
132 diversas enzimas. Além destes, elementos orgânicos como as vitaminas são
133 importantes para as microalgas, pois apresentam funções como de coenzimas e
134 transportadoras de CO₂ (Lourenço, 2006). Para a produção massiva de microalgas,
135 os meios de cultura devem conter os elementos essenciais, mas estes devem ser o
136 mais barato possível para viabilizar a produção em larga escala.

137

138 **1.5. Planejamento experimental**

139 Vários estudos sobre meios de cultivo foram realizados para outras espécies de
140 microalgas, testando fertilizantes e efluentes como alternativas viáveis de meio de
141 cultivo (Fernández-Linares et al., 2017; Nayak et al., 2016; Sipaúba-Tavares et al.,
142 2009). Trabalhos como estes buscaram o aumento da produção de biomassa variando
143 um parâmetro por vez, sendo necessários muitos ensaios e análises para avaliar todos
144 os parâmetros (Banerjee et al., 2016; Camacho-Rodríguez et al., 2013; Kumar et al.,

145 2015). Além disso, como as variáveis são estudadas separadamente, não é possível
146 identificar interações significativas entre essas.

147 A metodologia de planejamento experimental é uma ótima alternativa quando se
148 trabalha com muitas variáveis pois, além de diminuir o número de experimentos,
149 melhora a qualidade da informação obtida, uma vez que esta metodologia avalia
150 simultaneamente todas as variáveis testadas, possibilitando otimizar mais de uma
151 resposta e, ao mesmo tempo, mensurar a interação entre essas variáveis (Rodrigues,
152 2009). Pesquisas recentes têm buscado otimizar meios de cultura alternativos
153 utilizando essa metodologia (El-Sheekh et al., 2013; Kumaran et al., 2017). Entretanto,
154 não existe nenhum estudo semelhante para a microalga marinha *Conticribra*
155 *weissflogii*. Desta forma, com este estudo procurou-se estabelecer um meio de cultura
156 alternativo que possa ser empregado na produção em larga-escala desta microalga e
157 que garanta não só o bom crescimento da microalga, mas também que esta produza
158 em grande quantidade elementos de interesse comercial como proteínas e lipídeos.

159

160 **2. OBJETIVO**

161 **2.1. Objetivo geral**

162 Desenvolver um meio de cultivo massivo de baixo custo para a diatomácea *C.*
163 *weissflogii* e avaliar o seu efeito no crescimento e na composição bioquímica da
164 biomassa produzida.

165

166 **2.2. Objetivos específicos**

- 167 • Estabelecer a fonte de nitrogênio que resulta no maior crescimento de *C.*
168 *weissflogii*;

- 169 • Determinar as concentrações de cada componente de um meio fertilizante
170 que resultam no maior crescimento de *C. weissflogii*;
- 171 • Avaliar a relação custo/benefício do meio otimizado.
- 172 • Avaliar a composição bioquímica (proteína, lipídios e ácidos graxos) da
173 biomassa produzida no meio otimizado.

174

175 3. REFERÊNCIAS

- 176 Armbrust, E.V., 1990. The Life Cycle of the Centric Diatom *Thalassiosira weissflogii*:
177 Control of Gametogenesis and Cell Size.
- 178 Banerjee, A., Guria, C., Maiti, S.K., 2016. Fertilizer assisted optimal cultivation of
179 microalgae using response surface method and genetic algorithm for biofuel
180 feedstock. *Energy* 115, 1272–1290. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.09.066>
- 181 Borges, L., Morón-Villarreyes, J.A., D'Oca, M.G.M., Abreu, P.C., 2011. Effects of
182 flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae
183 *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and Bioenergy*
184 35, 4449–4454. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.003>
- 185 Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae-their development and
186 commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25, 743–756. [https://doi.org/10.1007/s10811-](https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9)
187 [013-9983-9](https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9)
- 188 Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by
189 microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19, 360–369.
190 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- 191 Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M.C., González-López, C. V., Fernández-
192 Sevilla, J.M., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E., 2013. A low-cost culture
193 medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for

194 aquaculture. Bioresour. Technol. 144, 57–66.
195 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.083>

196 Derner, R.B., 2006. Efeito de fontes de Carbono no crescimento e na composição
197 bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com
198 ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 158.

199 Edwards, A., 1997. Regional biological oceanography: an introduction. J. Exp. Mar.
200 Bio. Ecol. 217, 140–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-0981\(97\)00038-5](https://doi.org/10.1016/s0022-0981(97)00038-5)

201 El-Sheekh, M., Abomohra, A.E.F., Hanelt, D., 2013. Optimization of biomass and fatty
202 acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel
203 production. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 915–922.
204 <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1248-2>

205 Fernández-Linares, L.C., Guerrero Barajas, C., Durán Páramo, E., Badillo Corona,
206 J.A., 2017. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass
207 with treated wastewater as growth culture medium. Bioresour. Technol. 244, 400–
208 406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.141>

209 Garcia, N., Lopez Elias, J.A., Miranda, A., Martinez Porchas, M., Huerta, N., Garcia,
210 A., 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom
211 *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. Lat. Am. J. Aquat. Res. 40, 435–
212 440. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18>

213 Godoy, L.C., Odebrecht, C., Ballester, E., Martins, T.G., Wasielesky, W., 2012. Effect
214 of diatom supplementation during the nursery rearing of *Litopenaeus vannamei*
215 (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system. Aquac. Int. 20, 559–569.
216 <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9485-1>

217 Johnsen, M.N. (Ed.), 2012. Microalgae: Niotechnology, microbiology and Everyg. Nova
218 Science publishers, Inc.

219 Kumar, A., Pathak, A.K., Guria, C., 2015. NPK-10:26:26 complex fertilizer assisted
220 optimal cultivation of *Dunaliella tertiolecta* using response surface methodology
221 and genetic algorithm. *Bioresour. Technol.* 194, 117–129.
222 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.082>

223 Kumaran, J., Jose, B., Joseph, V., Bright Singh, I.S., 2017. Optimization of growth
224 requirements of marine diatom *Chaetoceros muelleri* using Response Surface
225 Methodology. *Aquac. Res.* 48, 1513–1524. <https://doi.org/10.1111/are.12987>

226 Lourenço, S.O., 2006. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. RiMa,
227 São Carlos.

228 Martins, T.G., Odebrecht, C., Jensen, L. V., D'Oca, M.G., Wasielesky, W., 2016. The
229 contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile
230 *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system. *Aquac. Res.* 47,
231 1315–1326. <https://doi.org/10.1111/are.12592>

232 Nayak, M., Thirunavoukkarasu, M., Mohanty, R.C., 2016. Cultivation of freshwater
233 microalga &i>Scenedesmus</i> sp. using a low-cost inorganic fertilizer
234 for enhanced biomass and lipid yield. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 62, 7–13.
235 <https://doi.org/10.2323/jgam.62.7>

236 Raposo, M.F. de J., De Moraes, R.M.S.C., De Moraes, A.M.M.B., 2013. Health
237 applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.* 93, 479–
238 486. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>

239 Raven, J.A., Giordano, M., 2014. *Algae. Curr. Biol.* 24, 590–595.
240 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.039>

241 Riviers, B. de, 2006. *Biologia e Filogenia das algas*. Artmed, Porto Alegre.

242 Rodrigues, M.I., 2009. *Planejamento de experimentos & otimização de Processos*, 2a
243 edição. ed. Casa do espírito amigo fraternidade fé e amor, Campinas, SP.

244 Santos-Ballardo, D.U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R.V., del Carmen Rendón-
245 Unceta, M., Caro-Corrales, J., Valdez-Ortiz, A., 2015. A simple spectrophotometric
246 method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture.
247 *Aquaculture* 448, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>

248 Sipaúba-Tavares, L.H., Ibarra, L.C.C., Fioresi, T.B., 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus*
249 *gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU 12 e
250 de macrófita com NPK. *Bol. do Inst. Pesca* 35, 111–118.

251 Sorgeloos, P.L.P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture.
252 Rome.

253 Stachura-Suchoples, K., Williams, D.M., 2009. Description of *Conticribra tricircularis*,
254 a new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship
255 to other continuous cribra species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its
256 freshwater origin. *Eur. J. Phycol.* 44, 477–486.
257 <https://doi.org/10.1080/09670260903225431>

258 Vella, F.M., Sardo, A., Gallo, C., Landi, S., Fontana, A., d'Ippolito, G., 2019. Annual
259 outdoor cultivation of the diatom *Thalassiosira weissflogii*: productivity, limits and
260 perspectives. *Algal Res.* 42, 101553. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101553>

261 Zheng, F.Y., Tu, T.X., Liu, F.J., Huang, X.G., Li, S.X., 2016. Influence of acidification
262 and eutrophication on physiological functions of *Conticribra weissflogii* and
263 *Prorocentrum donghaiense*. *Aquat. Toxicol.* 181, 11–21.
264 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.024>.

265 **Capítulo 1**

266

267

268

269

270

271 **Otimização de um meio de cultivo massivo de baixo custo para a microalga**

272 ***Conticribra weissflogii*, usando metodologia de superfície resposta**

273

274

275 Cynthia Couto, Fabio Roselet, Paulo Cesar Abreu

276

277

278 Laboratório de Produção de Microalgas, Instituto de Oceanografia, Universidade

279 Federal do Rio Grande – FURG, Av. Itália, Km 08, Rio Grande, RS 96201-900, Brasil

280

281

282

283

284

285

286

287 Artigo em preparação para submissão a revista Algal Research.

288 Fator de Impacto 3,723

289 **Resumo**

290 As diatomáceas são amplamente estudadas devido ao seu potencial na aquicultura
291 e na produção de biomoléculas. No entanto, para que esse potencial seja explorado
292 é preciso viabilizar sua produção em larga escala, que é muito afetada pelo custo do
293 meio de cultivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar um meio de cultivo de
294 baixo custo para a produção da diatomácea marinha *Conticribra weissflogii* e avaliar
295 a quantidade e qualidade da biomassa produzida. Para isso, primeiro se buscou a
296 fonte de nitrogênio que permite o maior crescimento para essa espécie. Em seguida,
297 foram avaliados quais componentes de um meio pré-estabelecido com fertilizantes
298 são essenciais para o crescimento da microalga, empregando-se a metodologia de
299 planejamento experimental. Esta técnica também foi empregada para se otimizar as
300 concentrações considerando-se o crescimento da microalga e custo/benefício do
301 novo meio de cultivo. Posteriormente foi feita uma análise de custo dos meios
302 produzidos. Por fim, foi analisada a composição da biomassa produzida nos meios
303 otimizados avaliando-se a produção de proteínas, lipídios e ácidos graxos. A
304 microalga teve maior crescimento em meio de cultivo com ureia como fonte de
305 nitrogênio. As concentrações dos elementos essenciais ureia, superfosfato,
306 metassilicato e biotina foram otimizadas tanto para o crescimento quanto para o
307 custo/benefício do meio. O meio otimizado para o melhor custo/benefício apresentou
308 uma redução no custo de 79,4% dos custos em comparação com o meio laboratorial
309 (F/2), apresentando também maiores percentuais de produção de proteína e lipídios,
310 sem alterações no perfil de ácidos graxos.

311

312 Palavras-chave: *Thalassiosira*, viabilidade, custo/benefício, planejamento
313 experimental.

314 1. Introdução

315 As diatomáceas constituem um dos grupos mais abundantes, tolerantes às mais
316 diversas condições ambientais e ecologicamente importantes do fitoplâncton. Nos
317 oceanos, são responsáveis por cerca de 40% da produtividade primária [1,2]. Além
318 de muito utilizadas na aquicultura, as diatomáceas são amplamente estudadas
319 devido ao seu potencial de produção de biomoléculas de interesse como pigmentos,
320 polissacarídeos e ácidos graxos [3].

321 Dentre as espécies de maior interesse está a *Conticribra weissflogii* (*Mediophyceae*),
322 anteriormente classificada como *Thalassiosira weissflogii* [4]. *C. weissflogii* é uma
323 diatomácea cêntrica marinha, que se destaca por suas altas taxas de crescimento,
324 robustez e alta capacidade de acumulação de lipídios, principalmente sob limitação
325 de nutrientes [5–7]. Contudo a sua produção em escala comercial ainda não é
326 considerada viável economicamente, devido ao custo elevado do meio de cultivo [8].

327 O meio *F/2* [9], apesar de ser um meio muito utilizado na produção de microalgas em
328 laboratório, não é considerado viável para a sua produção em larga escala pois é
329 constituído elementos com elevado grau de pureza, custando cerca de US\$15,6 por
330 1000 litros de cultivo [10], podendo chegar a representar mais da metade dos custos
331 totais de produção de biomassa. Por esse motivo, se faz necessária a formulação de
332 meios de cultivo de baixo custo, que utilizem fontes mais econômicas de matéria-
333 prima como os fertilizantes, para reduzir os custos sem prejudicar a produção [11–
334 13]. No entanto, a maioria dos trabalhos publicados testam fertilizantes já
335 formulados, com concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio definidas para o
336 cultivo de plantas terrestres, o que nem sempre é ideal para o cultivo de algas. Em
337 razão disso, são necessárias pesquisas que busquem não só baratear os meios,

338 mas encontrar as concentrações ótimas de nutrientes empregados para gerar maior
339 crescimento e produção de biomassa.

340 A otimização de meios de cultivo vem como uma opção de aumentar a produtividade
341 de uma espécie alvo. Encontrar as concentrações ideais de cada um dos elementos
342 permite aumentar a produtividade e reduzir custos. A metodologia de planejamento
343 experimental [14] é uma ótima alternativa quando se trabalha com muitas variáveis
344 pois, além de diminuir o número de experimentos, melhora a qualidade da
345 informação obtida, uma vez que avalia simultaneamente as variáveis, possibilitando
346 otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo e mensurar a interação entre essas
347 variáveis. Desta forma, esse estudo teve por objetivo otimizar as concentrações de
348 um meio de cultivo de baixo custo para a produção da diatomácea marinha
349 *Conticribra weissflogii* e avaliar a quantidade e composição centesimal da biomassa
350 produzida.

351

352 **2. Materiais e métodos**

353 **2.1. Cultivo da microalga**

354 A cepa da diatomácea *Conticribra weissflogii* foi obtida da coleção do Laboratório de
355 Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos, da Universidade Federal do Rio Grande. A
356 diatomácea foi cultivada em meio *F/2* [9], suplementado com sílica, em água
357 marinha natural (30 g/L), filtrada (1 μm) e autoclavada (121°C por 15 minutos). Os
358 cultivos foram realizados em batelada, sendo incubados a 21°C, com intensidade
359 luminosa de 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 12h:12h (Claro:Escuro), em
360 Erlenmeyer de 200 mL sem aeração ou correção do pH, com pH inicial de 8.6. A
361 densidade celular foi monitorada diariamente através de contagem celular em
362 câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 200 vezes [15]. Quando

363 a densidade atingia 80×10^4 células por mL, por volta do décimo segundo dia, o
 364 cultivo era usado como inóculo para os experimentos. Os experimentos empregaram
 365 o meio proposto por Yamashita & Magalhães [3], modificado com adição de cloreto
 366 férrico, metassilicato de sódio e das vitaminas tiamina, biotina e cianocobalamina
 367 nas mesmas concentrações do meio F/2 (meio Y, Tabela 1).
 368

Tabela 1. Composição dos meios testados, todos com 12,36 mg/L de nitrogênio. Y = meio Yamashita & Magalhães, YU = meio com ureia, YA = meio com amônia, F/2 = controle.

Nutrientes	Concentrações (mg/L)			
	F/2	Y	YU	YA
Ureia	-	2,65	26,88	-
Sulfato de amônio	-	53,05	-	127,67
Nitrato de sódio	75,00	-	-	-
Superfosfato triplo de cálcio	-	8,84	8,84	8,84
Fosfato de sódio	5,00	-	-	-
Metassilicato de sódio	30,00	30,00	30,00	30,00
Cloreto férrico	3,50	3,50	3,50	3,50
Sulfato de cobre	0,0098	-	-	-
Sulfato de zinco	0,022	-	-	-
Cloreto de cobalto	0,01	-	-	-
Cloreto de manganês	0,18	-	-	-
Molibdato de sódio	0,0063	-	-	-
EDTA	4,36	-	-	-
Tiamina (B ₁)	0,1	0,1	0,1	0,1
Biotina (B ₇)	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
Cianocobalamina (B ₁₂)	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005

369

370 2.2. Fonte de nitrogênio

371 No primeiro experimento buscou-se estabelecer qual fonte de nitrogênio (amônia ×
 372 ureia) que produz a maior densidade celular de *C. weissflogii*. O experimento foi
 373 composto por quatro tratamentos (em triplicata), onde se avaliou três variações do

374 meio fertilizante de Yamashita & Magalhães (Tabela 1): 1) tratamento Y com ureia e
375 sulfato de amônio como fontes de nitrogênio; 2) tratamentos YU apenas com ureia e
376 3) tratamento YA apenas com sulfato de amônia. O meio *F/2* foi usado como
377 controle. Apesar das diferentes fontes, as concentrações de nitrogênio em todos os
378 tratamentos (Y, YU e YA) foram iguais à do meio controle (*F/2*, 12,36 mg/L). Além
379 dos componentes do meio fertilizante Y, foram adicionadas as soluções de
380 metassilicato de sódio, cloreto férrico e solução de vitaminas (biotina, tiamina e
381 cianocobalamina) nas mesmas concentrações do meio *F/2* (Tabela 1). Cerca de 10%
382 de inóculo, em fase estacionária, foi adicionado em frascos tipo Erlenmeyer com
383 volume útil de 200 mL, sem aeração. Os frascos foram incubados a 21°C, com
384 intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2\cdot\text{s}$ e fotoper\u00edodo de 12h:12h (C:E). O
385 experimento teve dura\u00e7\u00e3o de 12 dias, diariamente foram coletadas amostras de 4
386 mL de cada unidade para determina\u00e7\u00e3o da densidade celular atrav\u00e9s de contagem
387 celular em microsc\u00f3pio \u00f3ptico com o aux\u00edlio de uma c\u00e2mara de Neubauer.

388

389 **2.3. Otimiza\u00e7\u00e3o do meio de cultivo**

390 **2.3.1. Varredura dos nutrientes significativos**

391 Ap\u00f3s a determina\u00e7\u00e3o da melhor fonte de nitrog\u00e9nio, foi feita uma varredura para
392 determinar quais nutrientes do meio fertilizante s\u00e3o significativos para o crescimento
393 de *C. weissflogii*. Para isto, foi realizado um delineamento experimental do tipo
394 Plackett & Burman [14] com 12 ensaios e 7 fatores (PB12), usando-se o software
395 STATISTICA.

396 Al\u00e9m dos pontos de v\u00e9rtice (-1 e +1) tamb\u00e9m foi empregado um ponto central (0),
397 em triplicata, para estimar a variabilidade. O experimento de varredura foi realizado
398 utilizando o tratamento YU (com ureia), que foi considerada no experimento anterior

399 como a melhor fonte de nitrogênio para *C. weissflogii*. O ponto central consistiu nas
 400 concentrações originais dos nutrientes e os pontos de vértice variaram em 30%, para
 401 mais e para menos (Tabela 2). Baseado nos resultados deste experimento, foi
 402 necessário realizar um segundo experimento de varredura para ajustar os níveis dos
 403 fatores (Tabela 3). Em ambos experimentos, as unidades experimentais foram
 404 frascos do tipo Erlenmeyer com volume útil de 400 mL, dotados de aeração (0,53
 405 L/min), onde cerca de 10% do volume do cultivo em fase estacionária foi adicionado
 406 como inóculo. Os frascos foram incubados a 21°C, com intensidade luminosa de 80
 407 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2.\text{s}$ e fotoperíodo de 12:12 (C:E). O experimento teve duração de 8
 408 dias e diariamente foram coletadas amostras de 4 mL de cada unidade para
 409 determinação da densidade celular através de contagem direta em microscópio
 410 óptico e hemocítmetro de Neubauer. A análise da varredura foi feita no quinto dia
 411 de cultivo, quando os cultivos atingiram o pico da fase exponencial de crescimento.
 412

Tabela 2. Fatores e níveis do primeiro experimento de varredura. Valores dos níveis expressos em mg/L.

Fatores		Níveis		
		-1	0	+1
X ₁	Ureia	18,81	26,88	34,94
X ₂	Superfosfato de cálcio	6,19	8,84	11,49
X ₃	Cloreto férrico	2,45	3,50	4,55
X ₄	Metassilicato de sódio	21,00	30,00	39,00
X ₅	Tiamina	0,07	0,10	0,13
X ₆	Biotina	0,00035	0,0005	0,00065
X ₇	Cianocobalamina	0,000035	0,00005	0,000065

413

Tabela 3. Fatores e níveis do segundo experimento de varredura. Valores dos níveis expressos em mg/L. Entre parênteses informa-se o nível de cada fator no primeiro experimento de varredura.

Fatores		Níveis		
		-1	0	+1
X ₁	Ureia	7,53	13,17	18,81 (-1)
X ₂	Superfosfato de cálcio	1,24	3,71	6,19 (-1)
X ₃	Cloreto férrico	0,00	1,75	3,50 (0)
X ₄	Metassilicato de sódio	39,00 (+1)	48,75	58,50
X ₅	Tiamina	0,000	0,035	0,070 (-1)
X ₆	Biotina	0,0000	0,0005 (0)	0,001
X ₇	Cianocobalamina	0,00000	0,00005 (0)	0.0001

414

415 **2.3.2. Otimização dos nutrientes importantes**

416 Após determinar os nutrientes do meio de cultivo que são mais importantes para o
 417 crescimento de *C. weissflogii*, foi realizado um Delineamento Composto Central
 418 Rotacional com 4 fatores e dois níveis (DCCR 2⁴) para definir as suas concentrações
 419 ideais, usando-se o software STATISTICA. A tabela 4 apresenta os fatores e os
 420 níveis do DCCR. Os níveis dos fatores avaliados foram determinados de acordo com
 421 os resultados dos experimentos de varredura. As unidades experimentais foram
 422 frascos do tipo Erlenmeyer com volume útil de 400 mL, com aeração. Cerca de 10%
 423 deste volume de um cultivo em fase estacionária foi utilizado como inóculo. Todos os
 424 frascos foram incubados a 21°C, com intensidade luminosa de 80 μmol fótons/m².s e
 425 fotoperíodo de 12:12 (C:E). O experimento teve duração de 8 dias e a densidade
 426 celular foi determinada diariamente por contagem celular. A análise da otimização foi
 427 feita no quinto dia de cultivo, quando os cultivos atingiram o pico da fase exponencial
 428 de crescimento. Baseado nos resultados experimentais obtidos, um modelo empírico

429 polinomial quadrático (Eq. 1) foi ajustado para correlacionar as variáveis
 430 independentes e a resposta.

$$431 \quad Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_4x_4 + \beta_6x_6 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{16}x_1x_6 + \beta_{24}x_2x_4 +$$

$$432 \quad \beta_{26}x_2x_6 + \beta_{46}x_4x_6 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{44}x_4^2 + \beta_{66}x_6^2 \quad \text{Eq. 1}$$

433 onde, Y representa a variável resposta (densidade celular), β é o coeficiente da
 434 equação e x_1 , x_2 , x_4 e x_6 são os níveis codificados das variáveis independentes.

435

Tabela 4. Fatores e níveis utilizados no DCCR 2⁴. Valores dos níveis expressos em mg/L.

Fatores		Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
X ₁	Ureia	7,52	14,36	21,19	28,03	34,86
X ₂	Superfosfato de cálcio	1,23	3,80	6,36	8,93	11,50
X ₄	Metassilicato de sódio	21,00	25,50	30,00	34,50	39,00
X ₆	Biotina	0,00	0,00025	0,0005	0,00075	0,001

436

437 Após os processos de otimização, foi realizada a validação do modelo empírico da
 438 densidade celular. Para isto, foi empregada a combinação das variáveis que gerou a
 439 melhor resposta, utilizando-se a função pontos críticos. A validação foi realizada em
 440 frascos do tipo Erlenmeyer com volume útil de 400 mL, em triplicata, dotados de
 441 aeração e inoculados com 10% de cultivo em fase estacionária. Os frascos foram
 442 incubados nas mesmas concentrações e condições dos experimentos anteriores. O
 443 experimento teve duração de cinco dias e a densidade celular foi determinada no
 444 último dia por microscopia ótica.

445

446 2.3.3. Otimização da relação de custo-benefício

447 Além de otimizar o meio de cultivo para gerar a maior densidade celular, também foi
 448 realizada a otimização de seu custo-benefício. Para isto, os custos dos componentes

449 do meio fertilizante (Y) foram determinados e adicionados como uma nova resposta
450 (custo) ao DCCR 2⁴ anterior, ajustando-se um modelo empírico linear (Eq. 2) para
451 correlacionar as variáveis independentes e a resposta.

$$452 \quad Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_4 x_4 + \beta_6 x_6 \quad \text{Eq. 2}$$

453 onde, Y representa a variável resposta (custo), β é o coeficiente da equação e $x_1, x_2,$
454 x_3 e x_4 são os níveis codificados das variáveis independentes.

455 A otimização da relação de custo-benefício foi realizada usando-se a técnica de
456 otimização com restrição (desejabilidade) [16]. Nesta técnica, é possível encontrar
457 os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam
458 simultaneamente todos os requisitos necessários às respostas. As respostas
459 preditas de densidade celular e custo são transformadas em um valor desejável d . A
460 escala da desejabilidade varia entre $d = 0$, o que sugere que a resposta é
461 minimizada, e $d = 1$, o que sugere que a resposta é maximizada. Para obter a
462 otimização da relação de custo-benefício, a resposta densidade celular foi
463 maximizada e a resposta custo foi minimizada. Além disto, foram realizadas
464 cinquenta simulações com pontos distintos, substituídos nas equações 1 e 2, para
465 obtenção dos valores ótimos das variáveis de resposta.

466

467 **2.4. Comparação do custo dos meios**

468 O custo do meio otimizado (YCB) foi comparado com os custos dos meios
469 Yamashita & Magalhães original (Y), Yamashita & Magalhães com ureia (YU) e F/2
470 (C). O custo de cada meio foi calculado pelo somatório da concentração final de
471 cada nutriente (Tabela 1), para um volume de 1.000 litros. Os preços dos nutrientes
472 foram estimados de fornecedores locais.

473

474 **2.5. Análise da biomassa**

475 Para verificar o efeito dos tratamentos na composição proximal da biomassa, foram
476 realizadas análises de peso seco, proteínas, lipídios e o perfil dos ácidos graxos nos
477 tratamentos Y, YC, YCB e C. Para isto, *C. weissflogii* foi cultivada em *carboys* de 20
478 litros por 10 dias. O peso seco foi determinado por filtração em filtros de fibra de
479 vidro GF/F previamente pesados, onde a biomassa filtrada foi lavada com formiato
480 de amônio (3%) para a remoção de sais [17].

481 Para as análises de proteína, lipídios e perfil de ácidos graxos, a biomassa foi coletada
482 através de floculação, com floculante catiônico de alto peso molecular a base de
483 policacrilamida (Flopam FO4800SH), conforme metodologia descrita por Roselet et al.
484 [18]. A biomassa foi lavada com uma solução de formiato de amônio e centrifugada
485 por 5 minutos a 4°C com uma força g de 2527. Após a coleta, as amostras foram
486 levadas à ultrafreezer (-80°C) e, após congeladas, foram liofilizadas.

487

488 **2.5.1. Análise de Proteínas**

489 Para a determinação de proteínas, 0,2 g das amostras dos cultivos passaram pelo
490 processo de digestão, destilação e titulação seguindo a metodologia AOAC 981.10
491 [19]. Os valores obtidos foram expressos em percentual de proteína por peso seco.

492

493 **2.5.2. Lipídios e perfil de ácidos graxos**

494 Os lipídios foram extraídos utilizando o método adaptado de Bligh & Dyer [20,21].
495 Onde a biomassa seca foi colocada em uma mistura de clorofórmio-metanol na
496 proporção de 2:1, para a determinação da fração lipídica, essa mistura foi
497 ultrassonificada e centrifugada três vezes e o solvente foi evaporado em evaporador
498 rotativo a vácuo. As frações lipídicas dos tratamentos foram esterificadas de acordo

499 com Metcalfe e Schmidt [22]. O perfil dos ácidos graxos foi caracterizado por
500 cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massas. Os ésteres
501 metílicos dos ácidos graxos foram identificados pela comparação com padrões
502 conhecidos e quantificados pelo método de padronização das áreas.

503

504 **2.6. Análise estatística**

505 Os dados foram analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade,
506 empregando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. No experimento
507 de determinação da fonte de nitrogênio foi feita uma ANOVA de duas vias com nível
508 de significância de 5%, seguida de um teste *post hoc* de Tukey. Nos experimentos
509 de varredura (PB12), os efeitos principais de cada fator foram calculados e
510 analisados por ANOVA, com um nível de significância de 10% [14,16]. No
511 experimento de otimização (DCCR), os efeitos e as interações de cada fator foram
512 calculados e analisados por ANOVA, com um nível de significância de 5% [14,16]. A
513 análise da relação de custo-benefício por otimização simultânea foi realizada
514 utilizando-se a função de desejabilidade [14,16]. A validação da otimização foi feita
515 pelo desvio relativo do valor observado em relação ao predito, sendo considerado
516 significativo um desvio inferior a 25% [14,16]. Todas as análises foram realizadas
517 empregando-se o pacote de Planejamento Experimental do software STATISTICA
518 versão 13.3 (TIBCO Software Inc., EUA).

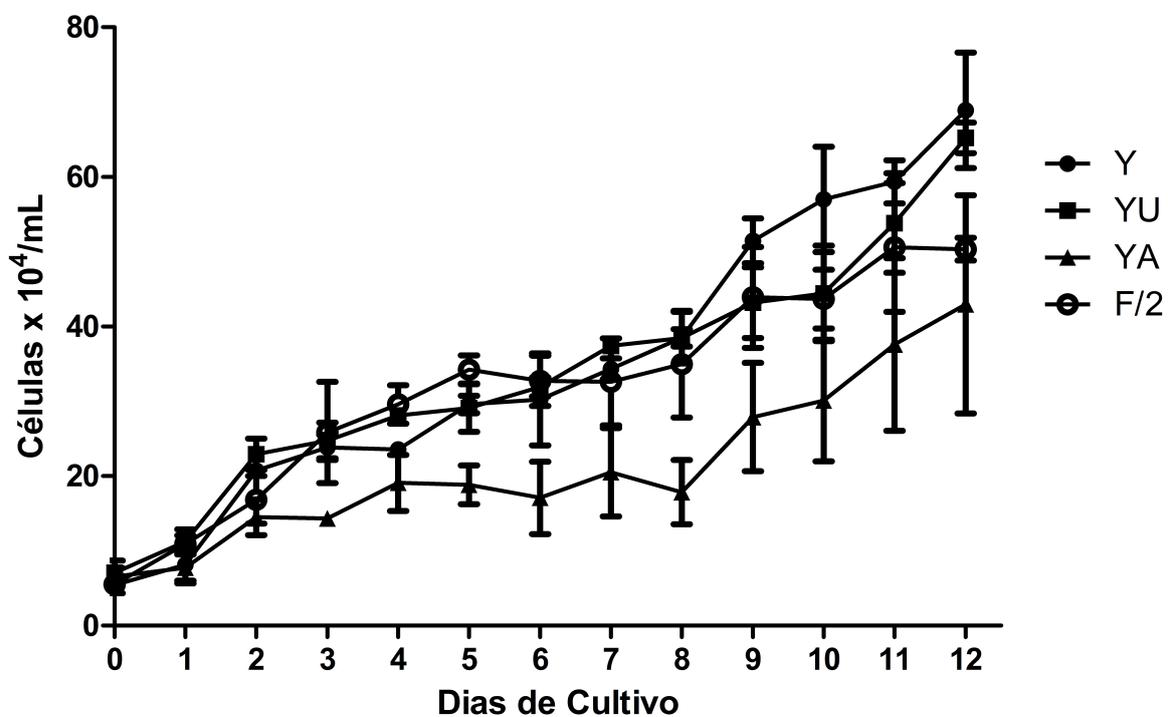
519

520 **3. Resultados**

521 **3.1. Determinação da fonte de nitrogênio.**

522 De acordo com a análise de variância, os tratamentos apresentaram diferença
523 significativa ($p \leq 0,05$) a partir do segundo dia de cultivo (Figura 1). Os tratamentos Y

524 e YU apresentaram a maior densidade celular ao fim do experimento, com $68,9 \times$
525 10^4 cél/mL e $65,2 \times 10^4$ cél/mL, respectivamente. O tratamento YA apresentou a
526 menor densidade celular, atingindo um máximo de $42,9 \times 10^4$ cél/mL. O tratamento
527 controle (C) apresentou uma densidade intermediária ($50,3 \times 10^4$ cél/mL), porém não
528 diferiu estatisticamente do tratamento YA. Como não houve diferença significativa
529 quanto a densidade celular entre os tratamentos Y e YU, se optou por continuar o
530 estudo com a ureia como única fonte de nitrogênio.
531



532

Figura 1: Médias e desvio padrão da densidade celular de *C. weissflogii* em diferentes fontes de nitrogênio. Y = meio Yamashita & Magalhães, YU = meio com ureia, YA = meio com amônia, F/2 = controle. Todos os meios possuem 12,36 mg/L de nitrogênio.

533

534 3.2. Otimização do meio de cultivo

535 3.2.1. Varredura dos nutrientes significativos

536 Na primeira varredura, as densidades celulares máxima e mínima atingidas foram de
537 $86,5 \times 10^4$ cél/mL e $7,6 \times 10^4$ cél/mL, respectivamente. Somente o metassilicato de
538 sódio e a biotina apresentaram efeito positivo significativo ($p \leq 0,1$), representando
539 um aumento de cerca de $27,9 \times 10^4$ e $24,5 \times 10^4$ cél/mL no cultivo, respectivamente
540 (Tabela 5). A tiamina, ao contrário, apresentou efeito significativo negativo ($p \leq 0,1$),
541 representando uma redução de $24,9 \times 10^4$ cél/mL no cultivo, evidenciando a
542 necessidade de reduzir a sua concentração. Quanto as variáveis que não
543 apresentaram qualquer efeito significativo, acredita-se que os intervalos testados
544 estavam fora da faixa ideal para *C. weissflogii*. Em razão disso, foi feita uma nova
545 varredura testando novos intervalos. Na segunda varredura, a densidade celular
546 máxima foi de $95,5 \times 10^4$ cél/mL e a mínima foi de $18,3 \times 10^4$ cél/mL, valores
547 superiores aos encontrados na primeira varredura, o que evidencia que os intervalos
548 testados estavam fora da faixa ideal. Ainda assim, nenhum fator apresentou efeito
549 significativo (Tabela 6). Desta forma, aqueles fatores cujo nível inferior (-1) foi zero
550 foram eliminados, pois não influenciaram o crescimento de *C. weissflogii*. Em
551 contrapartida, os fatores que apresentaram efeito significativo positivo na primeira
552 varredura, mas não na segunda, foram considerados como já tendo atingido a faixa
553 ideal de concentração e, conseqüentemente, aumento na concentração destes não
554 aumentou a resposta. Desta forma, apenas a ureia, o superfosfato de cálcio, o
555 metassilicato de sódio e a biotina foram considerados significativos para o
556 crescimento de *C. weissflogii*.

557

Tabela 5. Tabela de regressão com efeitos principais do primeiro experimento de varredura (PB12).

Fatores	Efeitos	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	46,45	4,91	9,46	0,000
X ₁ Ureia	-3,17	10,98	-0,29	0,781
X ₂ Superfosfato de cálcio	-18,08	10,98	-1,65	0,143
X ₃ Cloreto Férrico	10,33	10,98	0,94	0,378
X ₄ Metassilicato de sódio	27,92 *	10,98	2,54	0,038
X ₅ Tiamina	-24,92 *	10,98	-2,27	0,057
X ₆ Biotina	24,50 *	10,98	2,23	0,061
X ₇ Cianocobalamina	6,58	10,98	0,60	0,568

* Efeito significativo a $p \leq 0,1$

558

Tabela 6. Tabela de regressão com os efeitos principais do segundo experimento de varredura (PB12).

Fatores	Efeitos	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	60,49	4,89	12,37	0,000
X ₁ Ureia	18,79	10,94	1,72	0,129
X ₂ Superfosfato de Cálcio	3,87	10,94	0,35	0,733
X ₃ Cloreto Férrico	3,96	10,94	0,36	0,728
X ₄ Metassilicato de sódio	15,29	10,94	1,40	0,205
X ₅ Tiamina	-11,29	10,94	-1,03	0,336
X ₆ Biotina	-15,21	10,94	-1,39	0,207
X ₇ Cianocobalamina	0,54	10,94	0,05	0,962

559

560 3.2.2. Otimização dos fatores significativos

561 Com os fatores considerados significativos na varredura, foi realizada a otimização
 562 das suas concentrações. A Tabela 7 apresenta os resultados dos efeitos e interações
 563 do experimento de otimização por DCCR. O cálculo dos efeitos mostrou que
 564 somente a ureia (X₁) apresentou efeito linear, ou seja, aumentando a sua
 565 concentração resulta no aumento da densidade celular em $10,2 \times 10^4$ cél/mL. No

566 entanto, ureia, metassilicato de sódio (X_4) e biotina (X_6) apresentaram efeito
 567 quadrático negativo significativo, reduzindo a densidade celular em 17,6, 7,9, e 10,9
 568 $\times 10^4$ cél/mL, respectivamente. Além disso, a interação entre ureia e metassilicato de
 569 sódio (X_1X_4) foi positiva, com aumento de $10,8 \times 10^4$ cél/mL, assim como a interação
 570 entre o superfosfato de cálcio e o metassilicato de sódio (X_2X_4), com aumento de
 571 $12,7 \times 10^4$ cél/mL. Baseado nos resultados experimentais obtidos, um modelo
 572 empírico polinomial quadrático da densidade celular foi ajustado para correlacionar
 573 as variáveis independentes e a resposta (Eq. 3).

$$574 \text{ Densidade celular} = 88,40 + 5,09x_1 - 7,50x_1^2 - 4,13x_4^2 - 3,98x_6^2 + 5,40x_1x_4 +$$

$$575 6,37x_2x_4 \qquad \qquad \qquad \text{Eq. 3}$$

576

Tabela 7. Tabela de regressão com os efeitos e interações do experimento de otimização (DCCR). X_1 = ureia, X_2 = superfosfato de cálcio, X_4 = metassilicato de sódio e X_6 = biotina.

Fatores	Efeitos		Erro padrão	t	p
Média	95,42		5,32	17,95	0,000
X_1 (L)	10,19	*	3,76	2,71	0,019
X_1 (Q)	-17,63	*	3,99	-4,42	0,001
X_2 (L)	-5,12		3,76	-1,36	0,198
X_2 (Q)	-7,90		3,99	-1,98	0,071
X_4 (L)	3,27		3,76	0,87	0,401
X_4 (Q)	-10,90	*	3,99	-2,73	0,018
X_6 (L)	3,29		3,76	0,88	0,398
X_6 (Q)	-10,58	*	3,99	-2,65	0,021
X_1X_2	-4,12		4,60	-0,89	0,389
X_1X_4	10,79	*	4,60	2,34	0,037
X_1X_6	6,83		4,60	1,48	0,164
X_2X_4	12,73	*	4,60	2,77	0,017
X_2X_6	1,39		4,60	0,30	0,767
X_4X_6	0,51		4,60	0,11	0,914

* Efeito significativo $p \leq 0,05$

577

578 A Tabela 8 apresenta os resultados da análise de variância do modelo empírico
579 polinomial quadrático da densidade celular. Pode-se observar que o valor de F é 2,2
580 vezes maior que o valor de p e, portanto, o modelo pode ser considerado
581 significativo ($p < 0,05$). Da mesma forma, o modelo foi considerado preditivo pois o
582 coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 79,6%. Com base no modelo, foram
583 construídas as curvas de contorno da resposta densidade celular em função das
584 concentrações de ureia (mg/L), superfosfato triplo de cálcio (mg/L), metassilicato de
585 sódio (mg/L) e biotina ($\mu\text{g/L}$) (Figura 2).

586

Tabela 8. ANOVA da resposta densidade celular.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	p
Regressão	3289,74	6	548,29	5,77	2,60
Resíduo	1899,89	20	94,99		
Total	5189,62	26			

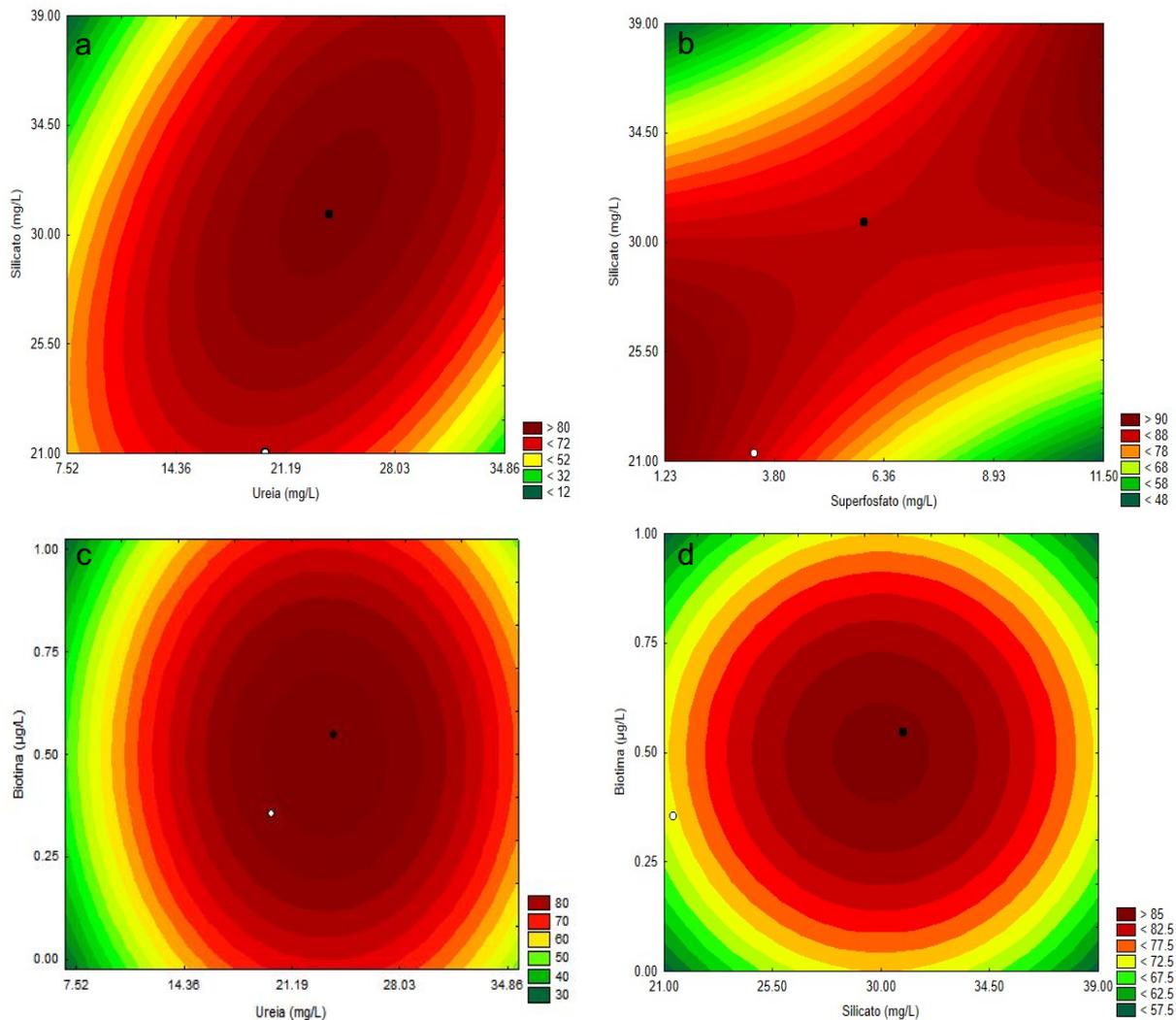
$R^2 = 0,79$ ($R = 0,88$)

587

588 As densidades celulares observadas experimentalmente variaram de $42,0 \times 10^4$
589 cél/mL a $98,5 \times 10^4$ cél/mL, apresentando um desvio médio em relação às
590 densidades preditas pelo modelo de -0,06 % (Tabela 9). De acordo com o modelo
591 obtido, os valores críticos que geraram a maior densidade celular (YC) foram 24,26
592 mg/L de ureia, 5,83 mg/L de superfosfato de cálcio, 31,17 mg/L de metassilicato de
593 sódio e 0,57 $\mu\text{g/L}$ de biotina (Figura 2). A validação experimental demonstrou que o
594 modelo é previsível, pois a densidade celular média experimental ($91,2 \times 10^4$ cél/mL)
595 apresentou um desvio de apenas 4,6 % em relação ao valor predito ($87,1 \times 10^4$
596 cél/mL).

Tabela 9. Valores codificados, resultados experimentais do DCCR e desvio em relação aos resultados preditos pelo modelo polinomial quadrático. X_1 = ureia, X_2 = superfosfato de cálcio, X_4 = metassilicato de sódio e X_6 = biotina.

	X_1	X_2	X_4	X_6	Predito ($\times 10^4$ cél/mL)	Experimental ($\times 10^4$ cél/mL)	Desvio relativo (%)
1	-1	-1	-1	-1	79,46	80,83	1,73
2	-1	-1	-1	+1	79,46	75,30	-5,23
3	-1	-1	+1	-1	55,93	56,20	0,48
4	-1	-1	+1	+1	55,93	59,40	6,20
5	-1	+1	-1	-1	66,73	68,50	2,66
6	-1	+1	-1	+1	66,73	68,75	3,03
7	-1	+1	+1	-1	68,66	64,00	-6,79
8	-1	+1	+1	+1	68,66	73,50	7,04
9	+1	-1	-1	-1	78,85	66,25	-15,98
10	+1	-1	-1	+1	78,85	92,00	16,67
11	+1	-1	+1	-1	76,92	72,50	-5,74
12	+1	-1	+1	+1	76,92	78,25	1,74
13	+1	+1	-1	-1	66,12	50,25	-24,00
14	+1	+1	-1	+1	66,12	62,50	-5,47
15	+1	+1	+1	-1	89,65	74,00	-17,45
16	+1	+1	+1	+1	89,65	92,33	2,99
17	-2	0	0	0	48,22	42,00	-12,89
18	+2	0	0	0	68,59	82,33	20,02
19	0	-2	0	0	88,40	90,25	2,10
20	0	+2	0	0	88,40	73,00	-17,42
21	0	0	-2	0	71,87	67,25	-6,42
22	0	0	+2	0	71,87	84,00	16,88
23	0	0	0	-2	72,49	83,75	15,53
24	0	0	0	+2	72,49	68,75	-5,16
PC ₁	0	0	0	0	88,40	95,75	8,32
PC ₂	0	0	0	0	88,40	98,50	11,43
PC ₃	0	0	0	0	88,40	92,00	4,08
						Média	-0,06



599

Figura 2: Curvas de contorno para a resposta densidade celular em função das variáveis estudadas: a) Ureia × silicato; b) Superfosfato × silicato; c) Ureia × biotina; d) Silicato × biotina. Os círculos pretos representam a combinação para obter a maior densidade celular, e os círculos brancos representam a combinação para obter a melhor relação de custo-benefício.

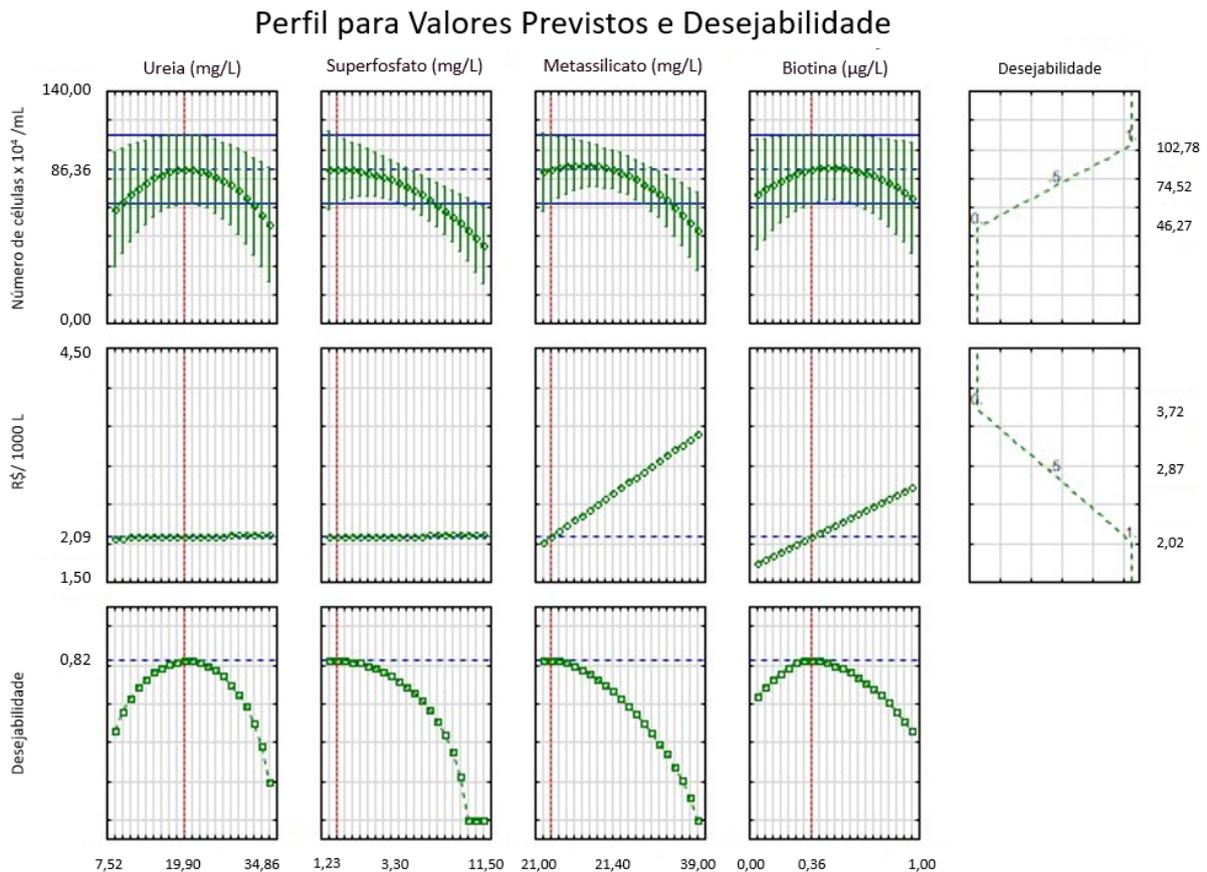
600 3.3. Otimização da relação de custo-benefício

601 Pelo modelo empírico linear do custo (Eq. 4), o metassilicato de sódio (X_4) e a
 602 biotina (X_6) foram os nutrientes que mais contribuiriam para o custo do meio.

$$603 \text{Custo} = 2,87 + 0,01x_1 + 0,004x_2 + 0,36x_4 + 0,26x_6 \quad \text{Eq. 4}$$

604 Desta forma, a otimização simultânea das respostas crescimento e custo levou à
 605 combinação que apresentou a maior densidade celular e as menores concentrações

606 de metassilicato de sódio e de biotina (Figura 3). Os pontos críticos que geraram a
 607 melhor relação de custo-benefício (YCB) foram 19,9 mg/L de ureia, 3,3 mg/L de
 608 superfosfato de sódio, 21,4 mg/L de metassilicato de sódio e 0,36 µg/L de biotina
 609 (Figura 3).
 610



611
 612
 613
 614
 615
 616
 617

Figura 3: Perfil de desejabilidade para otimização da relação de custo-benefício do meio otimizado para *C. weissflogii*.

3.4. Comparação do custo dos meios

614 A análise de custos demonstrou que a substituição do meio completo (*F/2*) pelo meio
 615 fertilizante original (com ureia e sulfato de amônio, *Y*) ou apenas com ureia (*YU*),
 616 representou uma redução média de 48,3% nos custos (Tabela 10). A otimização
 617 permitiu uma redução de 69,61%, enquanto que a otimização simultânea (*YCB*)

618 permitiu uma redução de 79,43 % do custo em relação ao meio F/2. Comparando-se
 619 o meio otimizado para crescimento (YC) e o otimizado para custo/benefício (YCB), a
 620 redução de custo foi de 32,4 %. Apesar da diferença de custos, a densidade celular
 621 obtida em ambos os meios foi semelhante, com uma redução de apenas 2,7 % para
 622 o meio YCB. O custo da biomassa foi reduzido em 73,3 % em relação ao meio F/2.
 623

Tabela 10. Custos para produzir 1000 L de cultivo e 1 kg de biomassa seca e redução dos custos pela substituição do F/2 pelos meios alternativos.

	(R\$/1000 L)	Redução do custo (%)	(R\$/Kg)	Redução do custo (%)
Meio F/2	9,84	-	68,81	-
Yamashita e Magalhães (Y)	5,17	47,42	36,93	46,33
Yamashita Ureia (YU)	5,00	49,17	30,67	55,42
Yamashita Crescimento (YC)	2,99	69,61	18,34	73,34
Yamashita Custo/benefício (YCB)	2,02	79,43	18,36	73,31

624

625 3.5. Análise da biomassa

626 Não houve diferença significativa entre o peso seco dos tratamentos, YU ($140 \pm$
 627 $0,042$ mg/L), YC ($163 \pm 0,022$ mg/L), YCB ($110 \pm 0,021$ mg/L) e F/2 ($143 \pm 0,009$
 628 mg/L) (Figura 4a). Já o percentual de proteína foi diferente nos tratamentos (Figura
 629 4b). O tratamento YU apresentou um percentual médio de $9,59\% \pm 1,98\%$, valor
 630 semelhante ao controle ($10\% \pm 0,48\%$). Já os tratamentos otimizados foram
 631 significativamente superiores ao controle, YC apresentando $13,05\% \pm 0,17\%$ e YCB
 632 $13,64 \pm 0,70\%$.

633 Os tratamentos que apresentaram o maior percentual de lipídios foram os
 634 tratamentos YCB e YU, com $18,93\% \pm 2,12\%$ e $16,77\% \pm 1,76\%$, respectivamente,
 635 seguidos por F/2 ($14,20\% \pm 0,66\%$) e YC ($12,87\% \pm 1,93\%$). Y foi semelhante
 636 estatisticamente a todos os tratamentos e YCB foi superior a F/2 e YC (Figura 4c).

637 De maneira geral, o perfil dos ácidos graxos foi o mesmo para todos os tratamentos
638 (Tabela 11), com exceção de YU que não apresentou a cadeia graxa 14:0. Não foi
639 possível identificar três cadeias graxas em todos os tratamentos, uma dessas
640 representa cerca 14% dos ácidos graxos totais.
641

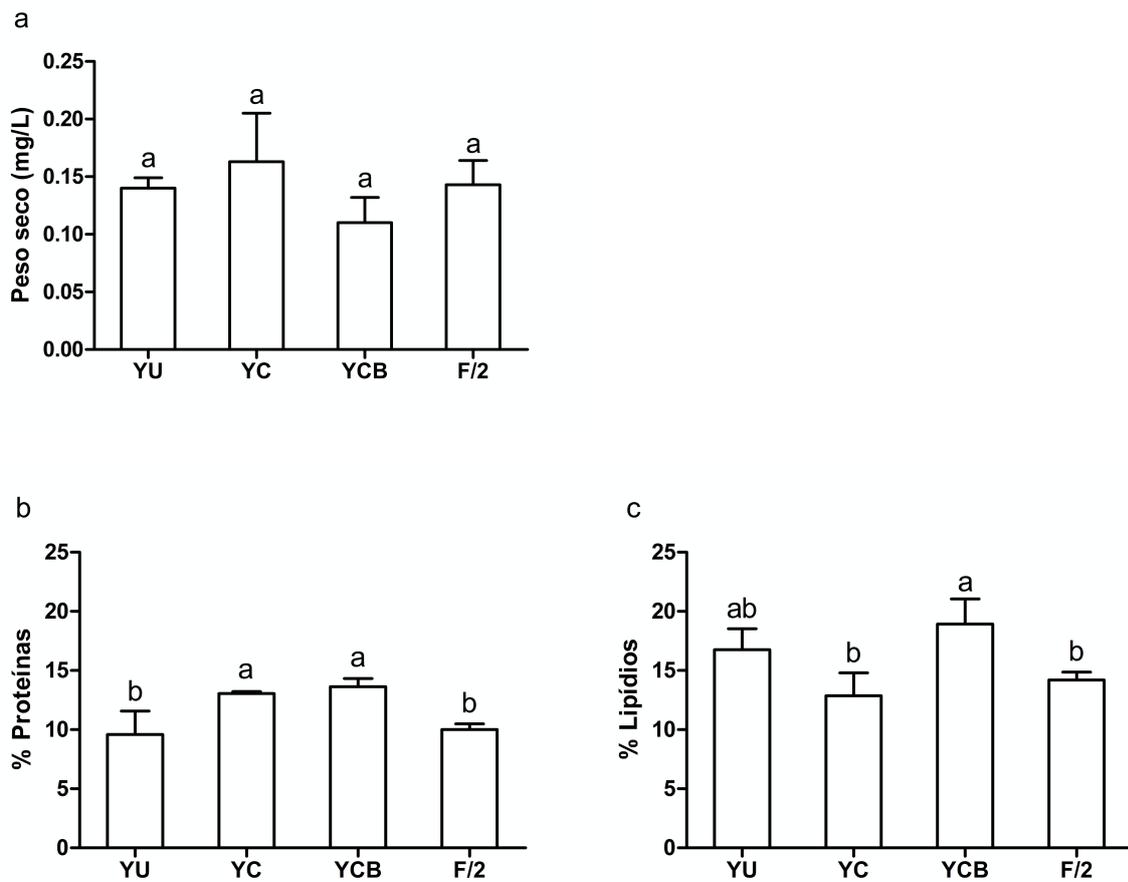


Figura 4: Análise da biomassa. a) Peso seco em mg/L. b) Percentual de proteínas e c) Percentual de lipídios. YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado pra custo benefício e F/2 = controle.

642

Tabela 11. Composição de ácidos graxos de *Conticribra weissflogii* nos tratamentos YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado para custo/benefício e F/2 = controle (AGS – Ácidos graxos saturados, AGI – Ácidos graxos insaturados e AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados).

Cadeia graxa*	YU	YC	YCB	F/2
C 14:0	12,84	16,51	14,43	12,81
C 14:1	0,31	0	0,32	0,35
C 15:0	1,50	1,94	1,53	1,79
C 16:0	14,37	22,41	16,21	15,95
C 16:1	21,72	24,49	20,03	20,80
C 16:2	11,66	4,80	9,29	10,31
C 18:0	0,37	0,59	0,53	0,50
C 18:1 (E)	0,74	1,38	1,31	0,85
C 18:2	0,86	0,93	1,20	0,77
C 18:3	0,71	0,72	0,85	0,75
C 20:5	12,79	8,68	12,04	14,24
C 22:6	2,47	1,88	2,86	2,62
**	14,51	10,21	13,96	14,07
**	2,62	1,91	2,13	2,13
**	2,50	1,65	3,30	2,07
AGS	29,08	41,45	32,70	31,05
AGI	22,77	25,87	21,66	22,00
AGPI	28,49	17,01	26,24	28,69
Não identificados	19,63	13,77	19,39	18,27

643 *Porcentagem por total de ácidos graxos.

644 **Cadeia graxa não identificada.

645

646 4. Discussão

647 4.1. Determinação da fonte de nitrogênio

648 Os resultados encontrados demonstraram que a ureia foi a melhor fonte de
649 nitrogênio para *C. weissflogii*, pois resultou na maior densidade celular. Nos
650 tratamentos onde houve suplementação de ureia (Y, YU) o crescimento foi cerca de
651 60% superior ao meio com apenas amônia. De uma forma geral, microalgas
652 apresentam taxas de crescimento mais altas quando o nitrogênio está em forma
653 reduzida, como no caso da ureia e da amônia, pois o custo energético de
654 assimilação é menor [23]. Entretanto, neste experimento o fornecimento apenas de

655 amônia como fonte de nitrogênio (YA) resultou na menor densidade celular. Essa
656 diferença pode ter ocorrido devido ao fato da amônia ser tóxica para algumas
657 espécies quando presente em concentrações elevadas, enquanto a ureia não
658 apresenta toxicidade [24].

659 A ureia é uma forma orgânica de nitrogênio, sendo que a sua assimilação depende
660 da capacidade da microalga em convertê-la em amônia, utilizando a enzima urease.
661 Diversas espécies de microalgas adquiriram esse tipo de enzima em resposta a
662 disponibilidade de ureia no meio, principalmente em regiões costeiras devido a um
663 enriquecimento do ambiente pelo aporte continental. Como a espécie *C. weissflogii* é
664 uma espécie estuarina, ela seria capaz de assimilar e reduzir a ureia, como
665 constatado por Lomas [25].

666 No tratamento controle (F/2), onde a fonte de nitrogênio era o nitrato, o crescimento
667 foi intermediário. Isto pode ser devido ao fato de o nitrato ser uma forma oxidada de
668 nitrogênio, acarretando um maior custo energético para converter este elemento em
669 uma forma reduzida (amônia) no interior da célula [23].

670

671 **4.2. Otimização do meio de cultivo**

672 **4.2.1. Varredura dos nutrientes essenciais**

673 Na primeira varredura, foi possível observar que apenas dois fatores foram limitantes
674 para o crescimento da microalga, o metassilicato e a vitamina biotina, pois a
675 diminuição nas concentrações de ambos gerou uma diminuição no crescimento. O
676 contrário do que foi observado para a vitamina tiamina, que apresentou efeito
677 negativo, mostrando que a redução das concentrações dessa vitamina favorece o
678 crescimento da microalga.

679 A segunda varredura permitiu a retirada do meio de elementos que não são
680 limitantes ao crescimento da *C. weissflogii*, como o cloreto férrico e as vitaminas
681 tiamina e cianocobalamina. Como foi utilizada água do mar, é possível que estes
682 micronutrientes já estivessem presentes no meio de cultura em concentrações
683 suficientes, não havendo a necessidade de sua suplementação. Além disso, no caso
684 das vitaminas, elas podem ser sintetizadas pelas próprias microalgas ou serem
685 resultado da interação simbiótica com bactérias [26]. Embora diversas vitaminas
686 estejam dissolvidas na água do mar em diferentes concentrações, só as vitaminas
687 do complexo B (tiamina, biotina e cianocobalamina) são importantes para as algas,
688 pois a maioria das algas não consegue sintetizar ao menos uma dessas vitaminas
689 [27,28].

690 Ao longo dos experimentos de varredura foi observado um aumento na resposta
691 (densidade celular), acompanhado da diminuição no intervalo entre os valores
692 máximos e mínimos. Este aumento na resposta e diminuição no intervalo evidencia
693 que o as concentrações testadas se aproximaram das ideais para a espécie.

694

695 **4.2.2. Otimização dos fatores significativos**

696 A interação entre a ureia e o metassilicato foi positiva, assim como foi a interação
697 entre o superfosfato e o metassilicato. Quando a interação entre duas variáveis é
698 significativa, seja positiva ou negativa, significa que a ação de uma variável é
699 dependente da concentração da outra [14]. Como em ambos os casos a interação
700 foi positiva, então só haverá aumento do crescimento se houver o aumento
701 consecutivo dessas variáveis, ou seja, as razões encontradas de N:Si (1,89:1) e Si:P
702 (5,97:1) (Tabela 12) devem ser mantidas para se atingir máximo crescimento.

Tabela 12. Balanço de massa entre a concentração de nitrogênio disponibilizada e a assimilada nos tratamentos YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado para custo benefício e F/2 = controle.

	Peso Seco (mg/L)	% N*	N na Biomassa (mg/L)	N Meio (mg/L)
YU	140	1,53	2,14	12,54
YC	163	2,09	3,41	11,31
YCB	110	2,18	2,40	9,28
F/2	143	1,60	2,29	12,36

703 *Valores estimados a partir do cálculo de proteínas.

704

705 **4.3. Otimização da relação custo-benefício**

706 Na técnica de otimização com restrição, os valores das variáveis são obtidos a partir
 707 da resposta desejada, ou seja, se descobre o quanto de cada fator deve ser
 708 adicionado para de se tenha essa resposta [29]. Nesse estudo, trabalhamos com
 709 duas respostas, a primeira, crescimento, obtida da equação do modelo (Figura 2) e a
 710 segunda referente ao custo para a produção do meio. Ao unir as respostas foi
 711 possível obter uma combinação que fornece o maior crescimento com o menor
 712 custo.

713 Apesar do meio fertilizante ser composto somente de macronutrientes, o
 714 crescimento de *C. weissflogii* neste tratamento não diferiu do controle F/2, mesmo
 715 este tendo este na sua composição diversos micronutrientes como cobre, zinco,
 716 cobalto, manganês e molibdato. Isso mostra que a adição destes elementos não é
 717 necessária, seja porque não são limitantes para *C. weissflogii*, ou porque as suas
 718 concentrações na água do mar são suficientes para garantir o crescimento dessa
 719 microalga.

720 A otimização do meio permitiu uma redução de 79,4% no custo em comparação com
721 o meio laboratorial *F/2* e 62.2% em relação ao meio com fertilizante (Y). Essa
722 redução faz com que a produção da biomassa de *C. weissflogii* se torne viável,
723 principalmente para aplicações que necessitam de matéria prima de baixo custo,
724 como o uso da biomassa como alimento vivo na aquicultura, ou na produção de
725 biodiesel. Essa diminuição no custo foi resultado da eliminação de elementos não
726 essenciais, e da diminuição nas concentrações dos elementos essenciais na
727 otimização, em especial do silicato e da biotina, que apresentaram os maiores
728 custos [2].

729

730 **4.4. Análise da biomassa**

731 A principal resposta das diatomáceas a uma condição onde há deficiência de
732 nutriente é ter o seu crescimento reduzido. Entretanto, a redução ou a retirada de
733 algum elemento do meio pode não causar uma redução no crescimento, mas
734 influenciar a composição bioquímica da biomassa produzida.

735 De maneira geral, as diatomáceas possuem baixo teor de proteínas, lipídios e
736 carboidratos em porcentagem de peso seco devido ao alto peso das suas frústulas
737 silicosas [30]. Uma diminuição da disponibilidade de sílica no meio pode provocar
738 uma diminuição no peso das frústulas e conseqüentemente um aumento desses
739 percentuais.

740

741 **4.4.1. Proteínas**

742 Os maiores percentuais de proteínas, ao contrário do que se pensava, não foram
743 encontrados nos tratamentos com maior concentração de nitrogênio (YU e *F/2*), e
744 sim nos tratamentos com as menores concentrações (YC e YCB). Isso sugere que,

745 apesar da concentração de nitrogênio serem menores nesses meios, este não foi
 746 limitante para a síntese proteica. Isso pode ser confirmado também através da
 747 análise do balanço de massa, que permite saber quanto de um nutriente foi
 748 aproveitado por um organismo em sistemas fechados. Para isto, foi feita a
 749 comparação do teor total de nitrogênio assimilado pelas microalgas com aquele
 750 disponível no meio. Assim, o balanço de massa de nitrogênio mostrou que a
 751 quantidade de nitrogênio disponibilizada no meio foi superior a quantidade que foi
 752 assimilada pela microalga em todos os tratamentos (Tabela 12). Ressalte-se que o
 753 percentual de proteínas foi maior nos tratamentos YC e YCB, que apresentaram a
 754 maior relação Si:P (Tabela 13), mostrando a importância da sílica para o crescimento
 755 desta microalga e produção de elementos nitrogenados como a proteína.
 756

Tabela 13. Número atômico dos elementos em cada meio ($\times 10^{20}$), suas concentrações entre parênteses (mg/L) e razão atômica entre N, P e Si nos meios YU = Yamashita com ureia, YC = meio otimizado para crescimento, YCB = meio otimizado para custo/benefício e F/2 = controle.

	N	P	Si	N:P	N:Si	Si:P
YU	3,99 (12,54)	0,16 (2,17)	1,06 (6,90)	12,76	3,64	3,50
YC	5,39 (11,31)	0,42 (1,43)	1,48 (7,17)	17,46	3,16	5,52
YCB	4,86 (9,28)	0,28 (0,81)	1,54 (4,92)	25,30	3,16	5,52
F/2	5,32 (12,36)	0,22 (1,12)	1,48 (6,90)	24,36	3,59	6,78

757

758 **4.4.2. Lipídios e perfil de ácidos graxos**

759 Os maiores percentuais de lipídios foram encontrados nos tratamentos YU e YCB.

760 Na literatura, o aumento deste elemento de reserva energética está relacionado a

761 limitação de nutrientes [31,32], o que condiz com os resultados obtidos, pois o
762 tratamento YCB continha as menores concentrações de ureia, superfosfato, silicato
763 e biotina. Da mesma forma, o tratamento YU continhas as menores concentrações
764 de silicato e biotina, indicando que a limitação de um, ou de ambos nutrientes pode
765 ter causado o aumento no percentual de lipídios. A redução de silicato e biotina na
766 produção em larga escala de *C. weissflogii* pode representar uma grande vantagem
767 na produção de lipídios para a produção de biocombustíveis, ou ácidos graxos.
768 O perfil de ácidos graxos obtidos para *C. weissflogii* neste estudo foi similar ao
769 encontrado na literatura para a espécie [33,34]. O ácido graxo que apresentou o
770 maior percentual foi o ácido palmitoléico (16:1), com cerca de 21% do total de ácidos
771 graxos. O percentual médio de ácidos graxos saturados (33,57%) foi superior ao dos
772 mono-insaturados (23,7%) e dos poli-insaturados (25,11%). O único tratamento que
773 apresentou diferença quanto o percentual de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos
774 graxos mono-insaturados (AGI) e ácidos graxos poli-insaturado (AGPI) foi YC, que
775 exibiu um perfil com mais AGS e menos AGPI. Já os demais tratamentos
776 apresentaram proporções semelhantes de AGS, AGI e AGPI (1,48:1:1,26). Esse tipo
777 de biomassa não é ideal para a produção de biocombustível, pois os AGPI são mais
778 suscetíveis a oxidação e oferecem pouca estabilidade ao biocombustível [35,36].
779 Entretanto, essa biomassa pode ser utilizada na aquicultura, que busca microalgas
780 com altos valores de AGPI, principalmente de ácido eicosapentaenoico (20:5), para a
781 alimentação [3]. Nos tratamentos otimizados a porção deste ácido graxo representou
782 cerca de 10% do conteúdo total.

783

784 5. Conclusões

785 A microalga *Conticribra weissflogii* apresentou maior crescimento com ureia como
786 fonte de nitrogênio. Além da ureia, os elementos essenciais ao cultivo desta espécie
787 foram superfosfato triplo de cálcio, metassilicato de sódio e biotina. Suas
788 concentrações foram otimizadas para se obter a maior densidade celular e a melhor
789 relação custo/benefício. Esse meio otimizado apresentou uma redução no custo de
790 79,4% em comparação com o meio laboratorial *F/2*, além maiores percentuais de
791 proteínas e lipídios. O perfil de ácidos graxos não sofreu modificações. Desta forma,
792 os resultados obtidos neste estudo mostram a viabilidade da produção comercial de
793 *C. weissflogii* em escala comercial, utilizando um meio mais barato, mas que
794 garantiu melhores níveis de produção de biomassa, proteína e lipídeo.

795

796 **Agradecimentos**

797 C. Couto foi financiada por uma bolsa de mestrado da Coordenação de
798 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, F. Roselet é pós-
799 doutorando da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
800 CAPES e P.C. Abreu é pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento
801 Científico e Tecnológico – CNPq.

802

803 **Referências**

- 804 [1] S. Malviya, E. Scalco, S. Audic, F. Vincent, A. Veluchamy, J. Poulain, P. Wincker,
805 D. Iudicone, C. De Vargas, L. Bittner, A. Zingone, C. Bowler, Insights into global
806 diatom distribution and diversity in the world's ocean, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.
807 A. 113 (2016) E1516–E1525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509523113>.
- 808 [2] M. Hildebrand, A.K. Davis, S.R. Smith, J.C. Traller, R. Abbriano, The place of
809 diatoms in the biofuels industry, Biofuels. 3 (2012) 221–240.

- 810 <https://doi.org/10.4155/BFS.11.157>.
- 811 [3] M.A. Borowitzka, High-value products from microalgae-their development and
812 commercialisation, *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 743–756.
813 <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>.
- 814 [4] K. Stachura-Suchoples, D.M. Williams, Description of *Conticribra tricircularis*, a
815 new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship
816 to other continuous cribra species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and
817 its freshwater origin, *Eur. J. Phycol.* 44 (2009) 477–486.
818 <https://doi.org/10.1080/09670260903225431>.
- 819 [5] Q. Lin, W.H. Zhuo, X.W. Wang, C.P. Chen, Y.H. Gao, J.R. Liang, Effects of
820 fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom
821 species *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*, *Bioprocess Biosyst.*
822 *Eng.* 41 (2018) 1213–1224. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1950-z>.
- 823 [6] E.A. Laws, S. Pei, P. Bienfang, Phosphate-Limited Growth of the Marine Diatom
824 *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae): Evidence of Non-Monod Growth
825 Kinetics¹, *J. Phycol.* 49 (2013) 241–247. <https://doi.org/10.1111/jpy.12047>.
- 826 [7] F.Y. Zheng, T.X. Tu, F.J. Liu, X.G. Huang, S.X. Li, Influence of acidification and
827 eutrophication on physiological functions of *Conticribra weissflogii* and
828 *Prorocentrum donghaiense*, *Aquat. Toxicol.* 181 (2016) 11–21.
829 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.024>.
- 830 [8] F.M. Vella, A. Sardo, C. Gallo, S. Landi, A. Fontana, G. D'Ippolito, Annual outdoor
831 cultivation of the diatom *Thalassiosira weissflogii*: productivity, limits and
832 perspectives, *Algal Res.* 42 (2019) 101553.
833 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101553>.
- 834 [9] R.R.L. Guillard, Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in:

- 835 Cult. Mar. Invertebr. Anim., 1975. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3.
- 836 [10] W.A. Faé Neto, C.R.M. Borges, P.C. Abreu, Carotenoid production by the marine
837 microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media, *Aquac.*
838 *Res.* (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1111/are.13715>.
- 839 [11] A. Kumar, C. Guria, G. Chitres, A. Chakraborty, A.K. Pathak, Modelling of
840 microalgal growth and lipid production in *Dunaliella tertiolecta* using nitrogen-
841 phosphorus-potassium fertilizer medium in sintered disk chromatographic glass
842 bubble column, *Bioresour. Technol.* 218 (2016) 1021–1036.
843 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.055>.
- 844 [12] N.T. Tuong, Optimization of Medium for the Production of a Novel Aquaculture
845 Probiotic, *Streptomyces* sp. A1 Using Central Composite Design of Response
846 Surface Methodology, 59 (2014) 25–32.
- 847 [13] A. Kirrolia, N.R. Bishnoi, R. Singh, Response surface methodology as a
848 decision-making tool for optimization of culture conditions of green microalgae
849 *Chlorella* spp. for biodiesel production, (2014) 1133–1147.
850 <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0752-4>.
- 851 [14] M.I. Rodrigues, Planejamento de experimentos & otimização de Processos, 2^a
852 edição, Casa do espírito amigo fraternidade fé e amor, Campinas, SP, 2009.
- 853 [15] A.M. Wood, R.C. Everroad, L.M. Wingard, Measuring Growth Rates in Microalgal
854 Cultures, in: *Algal Cult. Tech.*, 2005. [https://doi.org/10.1016/b978-012088426-](https://doi.org/10.1016/b978-012088426-1/50019-6)
855 [1/50019-6](https://doi.org/10.1016/b978-012088426-1/50019-6).
- 856 [16] V. Calado, D.C. Montgomery, Planejamento de experimentos usando Statistica,
857 E-papers Serviços editoriais, Rio de Janeiro, 2003.
- 858 [17] Y. Ishida, N. Hiragushi, H. Kitaguchi, a. Mitsutani, Original Article A highly CO₂
859 Tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, Enriched from Coastal Sea, and

- 860 Its Fatty Acid Composition, *Fish. Sci.* (2000) 655–659.
861 <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00105.x>.
- 862 [18] F. Roselet, D. Vandamme, M. Roselet, K. Muylaert, P.C. Abreu, Effects of pH,
863 Salinity, Biomass Concentration, and Algal Organic Matter on Flocculant
864 Efficiency of Synthetic Versus Natural Polymers for Harvesting Microalgae
865 Biomass, *Bioenergy Res.* 10 (2017) 427–437. [https://doi.org/10.1007/s12155-](https://doi.org/10.1007/s12155-016-9806-3)
866 [016-9806-3](https://doi.org/10.1007/s12155-016-9806-3).
- 867 [19] AOAC, Official methods of analysis, association of analytical chemists. 15th ed.,
868 Washington D. C., Washingt. D. C. USA. (2000). [https://doi.org/10.1007/978-3-](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31241-0)
869 [642-31241-0](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31241-0).
- 870 [20] M.G.M. D’oca, C. V Vie, J.S. Lemo, E.K. Miyasaki, Production of FAMEs from
871 several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella*
872 *pyrenoidosa*, 5 (2011) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.047>.
- 873 [21] W.J. Bligh, E.G. and Dyer, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*,
874 *Can. J. Biochem. Physiol.* (1959).
- 875 [22] L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas
876 Chromatographic Analysis, *Anal. Chem.* (1961).
877 <https://doi.org/10.1021/ac60171a016>.
- 878 [23] S.J. Bender, M.S. Parker, E.V. Armbrust, Coupled Effects of Light and Nitrogen
879 Source on the Urea Cycle and Nitrogen Metabolism over a Diel Cycle in the
880 Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Protist.* 163 (2012) 232–251.
881 <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.07.008>.
- 882 [24] C.M. Solomon, J.L. Collier, G.M. Berg, P.M. Glibert, Role of urea in microbial
883 metabolism in aquatic systems: A biochemical and molecular review, *Aquat.*
884 *Microb. Ecol.* 59 (2010) 67–88. <https://doi.org/10.3354/ame01390>.

- 885 [25] M.W. Lomas, Nitrate reductase and urease enzyme activity in the marine diatom
886 *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae): Interactions among nitrogen
887 substrates, *Mar. Biol.* 144 (2004) 37–44. [https://doi.org/10.1007/s00227-003-](https://doi.org/10.1007/s00227-003-1181-x)
888 1181-x.
- 889 [26] M.T. Croft, A.D. Lawrence, E. Raux-Deery, M.J. Warren, A.G. Smith, Algae
890 acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria, *Nature*. 438
891 (2005) 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature04056>.
- 892 [27] S.O. Lourenço, *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*, RiMa,
893 São Carlos, 2006.
- 894 [28] S.J. Giovannoni, Vitamins in the sea, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012)
895 13888–13889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211722109>.
- 896 [29] G.N. Rallis, V.A. Sakkas, V.A. Boumba, T. Vougiouklakis, T.A. Albanis,
897 Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in
898 post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of
899 response surface methodology and desirability function, *J. Chromatogr. A.* 1227
900 (2012) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.083>.
- 901 [30] Z. V. Finkel, M.J. Follows, J.D. Liefer, C.M. Brown, I. Benner, A.J. Irwin,
902 Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae, *PLoS*
903 *One*. 11 (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155977>.
- 904 [31] K.K. Sharma, H. Schuhmann, P.M. Schenk, High lipid induction in microalgae for
905 biodiesel production, *Energies*. 5 (2012) 1532–1553.
906 <https://doi.org/10.3390/en5051532>.
- 907 [32] J. Longworth, D. Wu, M. Huete-Ortega, P.C. Wright, S. Vaidyanathan, Proteome
908 response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by
909 nitrogen depletion, *Algal Res.* 18 (2016) 213–224.

- 910 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.015>.
- 911 [33] Y. Li, M. Ye, R. Zhang, J. Xu, C. Zhou, X. Yan, Lipid compositions in diatom
912 *Conticribra weissflogii* under static and aerated culture conditions, *Phycol. Res.*
913 64 (2016) 281–290. <https://doi.org/10.1111/pre.12144>.
- 914 [34] L. Borges, J.A. Morón-Villarreyes, M.G.M. D'Oca, P.C. Abreu, Effects of
915 flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae
916 *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*, *Biomass and Bioenergy.*
917 35 (2011) 4449–4454. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.003>.
- 918 [35] H.C. Greenwell, L.M.L. Laurens, R.J. Shields, R.W. Lovitt, K.J. Flynn, Placing
919 microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges,
920 *J. R. Soc. Interface.* 7 (2010) 703–726. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0322>.
- 921 [36] M. Hildebrand, A.K. Davis, S.R. Smith, J.C. Traller, R. Abbriano, The place of
922 diatoms in the biofuels industry, *Biofuels.* 3 (2012) 221–240.
923 <https://doi.org/10.4155/BFS.11.157>.
- 924

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A microalga *Conticribra weissflogii* não teve maior crescimento com a amônia como fonte de nitrogênio, crescendo melhor com ureia;
- A metodologia de planejamento experimental foi efetiva para a formulação de um meio de cultivo de baixo custo para *Conticribra weissflogii*. Além de otimizar as concentrações do meio para crescimento e custo/benefício, essa metodologia indicou a presença de interação entre os fatores;
- A formulação deste meio permitiu uma redução no custo do meio de 79,4%, fator de extrema importância para a viabilização do cultivo dessa espécie, principalmente para o uso na aquicultura;
- A substituição do meio laboratorial pelo meio de baixo custo apresentou um aumento nos percentuais de proteínas e lipídios sem alterar o perfil de ácidos graxos.

PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS

A partir das hipóteses estudadas e resultados obtidos novos questionamentos surgiram, dentre eles:

- Foram feitas análises somente para proteínas, lipídios e ácidos graxos, porém outros componentes da biomassa produzida podem ter sido afetados pela utilização deste meio, como por exemplo os pigmentos;
- Todos os experimentos foram realizados em escala de bancada, analisar a reprodutibilidade da produção em larga escala é fundamental para determinar se o modelo é preditivo para o cultivo massivo dessa espécie;
- Três ácidos graxos que apresentaram percentual significativo foram observados, mas não foram identificados. Fazer novas análises e buscar identificar esses ácidos graxos pode aumentar o potencial de utilização da biomassa produzida para outros propósitos;
- Desenvolver meios otimizados para máxima produção de lipídios e proteínas.