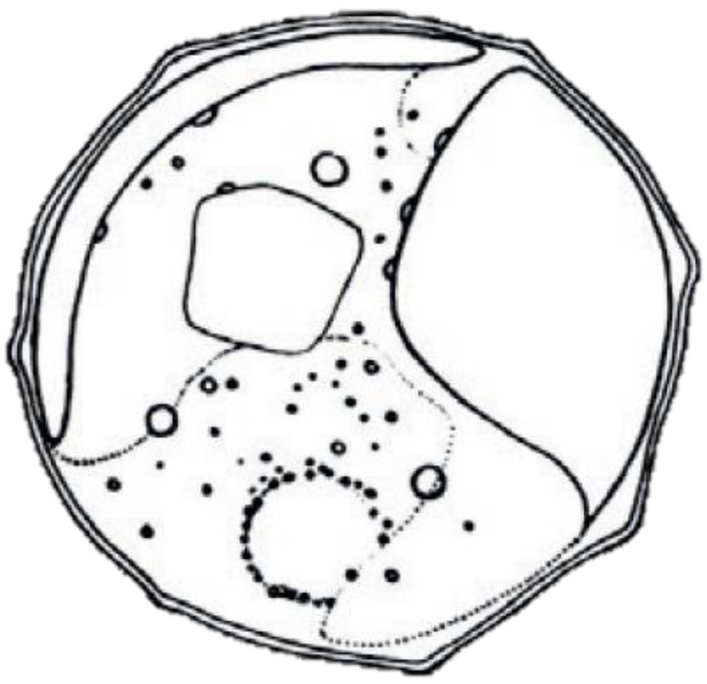
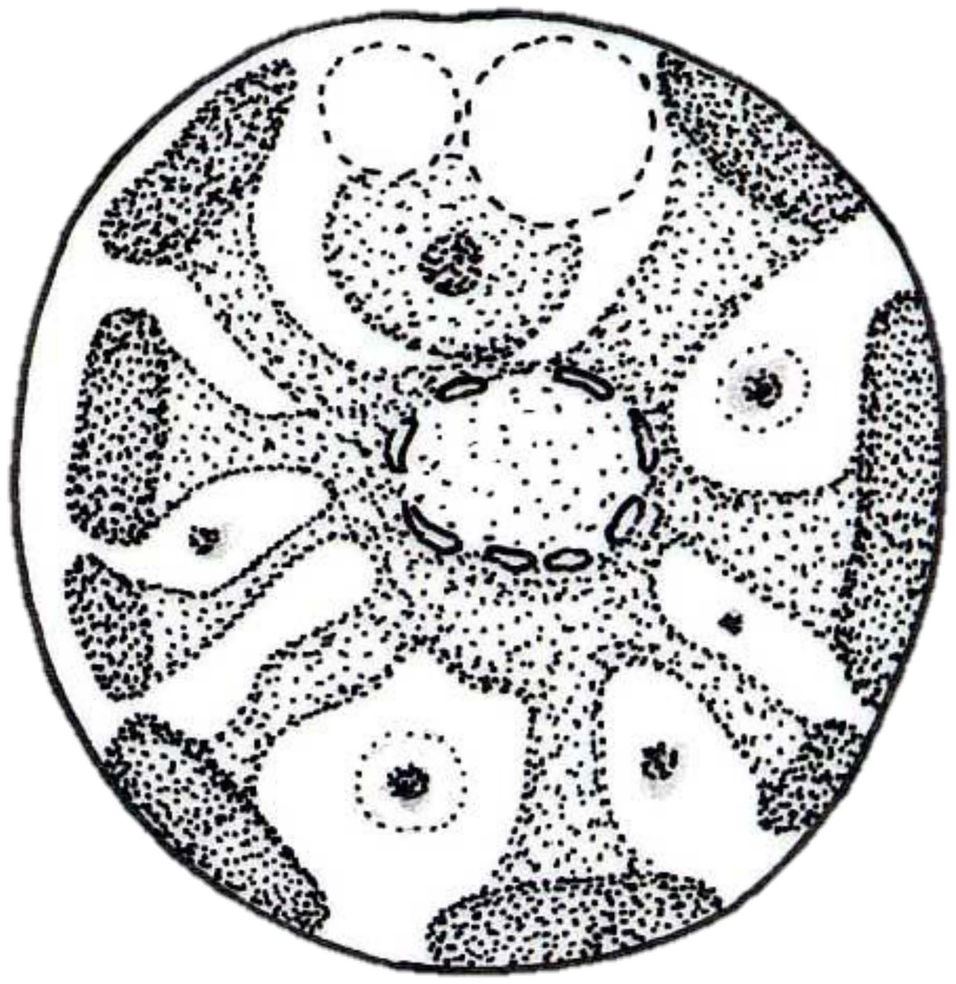


Vischeria helvetica (Vischer & Pascher) D.J. Hibberd



Asterococcus korschikoffii Ettl

Maria João Alves Correia

Cultivo de *Vischeria helvetica* e *Asterococcus korschikoffii* em sistema unialgal e misto e determinação do seu conteúdo lipídico

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pela Prof. Doutora Lília Maria Antunes dos Santos e coorientada pelo Prof. Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão,
apresentada ao Departamento Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra..

Julho de 2016

· U C ·

Universidade de Coimbra

Cultivo de *Vischeria helvetica* e *Asterococcus korschikoffii* em sistema unialgal e misto e determinação do seu conteúdo lipídico

Maria João Alves Correia

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal

Julho de 2016

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Lília Maria Antunes dos Santos (Universidade de Coimbra) e sob a coorientação do Professor Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão (Escola Superior Agrária de Coimbra).

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Créditos das imagens da capa: *Vischeria helvetica* (Ettl, H. and Gärtner, G. *Syllabus der Boden-, Luft-und Flechtenalgen* (1995). Gustav Fischer Verlag); *Asterococcus korschikoffii* (http://acoi.ci.uc.pt/)

Em memória da minha querida Juvelina,

Porque tudo aquilo que sou e serei terá sempre um bocadinho de ti!

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Lília Santos, por me ter dado a oportunidade de integrar este grupo de investigação, pela orientação sempre disponível e atenta, bem como por todas as revisões na escrita desta tese.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Jorge Varejão, por toda a orientação, correções científicas e também por toda a disponibilidade.

Às minhas colegas de laboratório, por me terem acolhido neste laboratório e por me fazerem sentir em casa. Um agradecimento muito especial à Mariana e à Raquel por toda a disponibilidade, por toda a ajuda fundamental no laboratório, por todas as ideias trocadas ao longo do trabalho e sobretudo pela enorme paciência que tiveram comigo.

À D. Isabel Matos, por todo o auxílio prestado e pela boa disposição que se fez sentir no laboratório.

Aos meus colegas de mestrado, por terem partilhado esta etapa comigo, por todo o companheirismo e amizade.

Aos meus pais e irmãos que me apoiam incondicionalmente e que, apesar da distância, estão sempre perto.

Ao Rodrigo por ser o Rodrigo!

Índice

Resumo ..... **IX**

Abstract ..... **XI**

1. Introdução **1**

1.1 Microalgas 3

1.1.1 Género *Vischeria* Pascher 3

1.1.1.1 *Vischeria helvetica* (Vischer & Pascher) D.J. Hibberd 5

1.1.2 Género *Asterococcus* Scherffel 6

1.1.2.1 *Asterococcus korschikoffii* Ettl 7

1.2 Interesse biotecnológico das microalgas 8

1.2.1 Lípidos das microalgas 9

1.2.1.1 Extração de lípidos 16

1.3 Cultivo de microalgas para exploração de compostos 20

1.3.1 Sistemas abertos 23

1.3.2 Fotobiorreatores 24

1.3.3 Sistemas abertos versus fotobiorreatores fechados 25

1.4 Culturas mistas 27

1.5 Contextualização e Objetivos 30

2. Materiais e Métodos **33**

2.1 Material de estudo 35

2.2 Estabelecimento e crescimento de culturas 35

2.2.1 Monoculturas 36

2.2.2 Culturas mistas 38

2.2.3 Culturas para a extração de lípidos 39

2.3 Extração de lípidos 40

2.3.1 Extração com Soxhlet 41

2.3.2 Extração com MTBE 41

2.3.3 Extração segundo Gao *et al* (2015) 42

2.4 Separação das frações lipídicas 42

3. Resultados **45**

3.1 Crescimento das culturas 47

3.1.1 Monoculturas 47

3.1.2 Culturas mistas 49

3.2 Lípidos 53
3.2.1 Monoculturas 53
3.2.2 Culturas mistas 57
4. Discussão 59
4.1 Critérios de seleção das microalgas 61
4.2 Crescimento das culturas 62
4.2.1 Monoculturas 62
4.2.2 Culturas mistas 64
4.3 Lípidos 70
4.3.1 Monoculturas 70
4.3.2 Culturas mistas 74
5. Conclusões 77
6. Bibliografia 81

Resumo

As microalgas têm-se revelado organismos com grande potencial para a produção de compostos que podem ter aplicações comerciais em diversas áreas como a aquacultura, nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e nas indústrias alimentar, química ou farmacêutica. A grande variabilidade dos compostos produzidos, aliada ao seu cultivo em grande escala tem permitido a utilização comercial de algumas espécies. A grande maioria são monoculturas, produtoras de compostos particulares, como é o caso dos lípidos. No entanto, estudos recentes demonstram que as monoculturas são difíceis de manter, já que são susceptíveis a contaminações por parte de outros organismos, especialmente quando em sistemas de cultivo abertos. Culturas mistas de duas ou mais espécies começam a surgir como alternativa, sendo uma forma de aumentar e estabilizar a produtividade.

O presente estudo teve como objetivo estabelecer uma cultura mista composta por duas espécies de microalgas biotecnologicamente interessantes, tendo em conta que o efeito sinergético do cultivo misto pode resultar numa maior produtividade de biomassa e/ou de compostos de interesse. *Vischeria helvetica* ACOI 299 (Vischer & Pascher) Hibberd e *Asterococcus korschikoffii* ACOI 326 Ettl foram inicialmente caraterizadas em cultivo unialgal, quanto ao crescimento e conteúdo lipídico nas fases exponencial e estacionária. Os mesmos parâmetros foram avaliados para as culturas mistas, em que foram testadas duas estratégias, uma com as estirpes em igual proporção (1:1) e outra com maior densidade inicial de *V. helvetica* (4:1). Para a determinação das curvas de crescimento de cada microalga, foram utilizadas duas metodologias, peso seco (mg/ml) e densidade celular (células/ml). No caso da extração de lípidos, foram testados três métodos, baseados em extração com solventes. Depois de obtido o lípido total de cada microalga por cada um dos métodos, este foi sujeito a fracionamento de modo a separar as diferentes classes lipídicas em lípidos neutros, glicolípidos e fosfolípidos. Nas condições de cultivo estabelecidas, *V. helvetica* apresentou um crescimento rápido, aumentando em 16 vezes o seu peso seco e atingiu 2,15 mg/ml aos 27 dias de cultura. No mesmo período de tempo, *A. korschikoffii* aumentou o seu peso em 5 vezes e não atingiu 1 mg/ml de peso seco. Quando expresso em densidade celular, *V. helvetica* aumentou 7 vezes o seu número de células, enquanto *A. korschikoffii* aumentou 4 vezes. Em relação ao teor de lípido total, o máximo obtido para *V. helvetica* foi 294,00 mg de lípido/g de biomassa e para *A. korschikoffii* foi 162,22 mg/g.

Em relação às culturas mistas, foi observada uma relação inversamente proporcional entre o teor de lípido total e a produção de biomassa. A estratégia 1:1 apresentou maior produção e produtividade de biomassa. Contrariamente, na estratégia 4:1 foram obtidos valores baixos de biomassa, mas valores de lípido total mais elevados, particularmente aos 6 dias com 182,86 mg/g, valor superior aos registados para qualquer uma das monoculturas para o mesmo período. Os resultados sugerem que a cultura mista com mais quantidade de *V. helvetica* (4:1), após 6 dias de crescimento é indicada para obtenção de elevada produção de lípidos e também que o cultivo misto de *A. korschikoffii* e *V. helvetica* em igual proporção (1:1) favorece a produção de biomassa de *A*. *korschikoffii.*

Palavras-chave: *Vischeria helvetica; Asterococcus korschikoffii;* microalgas; culturas mistas; extração de lípidos; lípidos neutros; glicolípidos; fosfolípidos

Abstract

Microalgae have a high potential for the production of compounds that may have commercial applications in areas such as aquaculture, nutrition, human and animal health, waste water treatment, energy production and food, chemical and pharmaceutical industries. The great variability of these compounds, together with the application of large-scale cultivation has allowed the commercial use of some species. Most cultures of algae are grown as a monoculture since specific strains produce specific high value products, like for example lipids. However, some studies have shown that monocultures are difficult to maintain since they are susceptible to contamination by other organisms, especially when growing in open tanks. Therefore mixed cultures of two or more species can be an alternative that may increase and stabilize productivity.

The aim of this study was to establish a mixed culture of two microalgae with biotechnological potential, considering that the cultivation of both species can result in higher productivity of biomass and/or interesting compounds. *Vischeria helvetica* ACOI 299 (Vischer & Pascher) Hibberd and *Asterococcus korschikoffii* ACOI 326 Ettl were initially characterized in unialgal systems, regarding growth and lipid content in the exponential and stationary phases. These parameters were also evaluated in mixed cultures, in which two strategies were tested, one with the same proportion of the two species (1:1) and the other with *V. helvetica* in a higher initial density (4:1). Growth curves were established by dry weight (mg/ml) and also by cell counting (cell/ml). For the lipid extraction, three methods based on solvent extraction were tested. The total lipid extracts were submitted to fractionation in order to separate the main lipid classes, neutral lipids, glycolipids and phospholipids.

In the established culture conditions, *V. helvetica* showed a rapid growth, increasing 16-fold in dry weight and reaching 2.15 mg/ml after 27 days of culture. For the same period of time, *A. korschikoffii* increased 5-fold and did not reach 1 mg/ml of dry weight. Growth estimated by cell counting showed an increase of 7-fold for *V. helvetica* and 4-fold in *A. korschikoffii.* Regarding the total lipid content, the maximum obtained for *V. helvetica* was 294.00 mg of lipid/g of dried biomass and 162.22 mg/g for *A. korschikoffii.* For the mixed cultures, an inversely proportional relationship between the total lipid content and the biomass was observed. The 1:1 strategy showed a higher biomass production and productivity in contrast with 4:1 strategy that showed low biomass values. However, total lipid content obtained was higher than recorded for each monoculture at the same period,

particularly after 6 days of culture with 182.86 mg/g. The results suggest that the mixed culture with higher density of V. *helvetica* (4:1), after 6 days of culture is the most indicated for obtaining high lipid content and that the mixed culture of *A. korschikoffii* and *V. helvetica* in equal proportions (1:1) favors the biomass production of *A. korschikoffii.*

Keywords: *Vischeria helvetica; Asterococcus korschikoffii;* microalgae; mixed cultures; lipid extraction; neutral lipids; glycolipids; phospholipids

1. Introdução

1.1 Microalgas

As microalgas são organismos ubiquistas, que podem ocupar os habitats mais inóspitos, como a neve em montanhas de altitudes elevadas, rochas nuas onde vivem em associações com fungos, constituindo líquenes, em solos desertos ou em fontes termais. Nos habitats aquáticos funcionam como a base da cadeia alimentar, já que têm a capacidade de realizar fotossíntese e produzir matéria orgânica a partir de dióxido de carbono e água, sendo responsáveis pela produção da maior parte do oxigénio necessário ao metabolismo dos organismos aeróbios (Lee, 2008; Wehr *et al*, 2015).

As microalgas representam um recurso valioso pouco explorado e a sua biodiversidade é enorme (Pulz & Gross, 2004; Guedes & Malcata, 2012). O número exato de espécies não é conhecido, contudo são estimados entre 200 000 até alguns milhões de representantes deste grupo (Pulz & Gross, 2004; Derner *et al*, 2006). Destes, apenas alguns milhares são mantidos em coleções em todo o mundo, só algumas centenas foram investigados do ponto de vista químico e muito poucas têm sido cultivadas em quantidades industriais (Olaizola, 2003). As espécies de algas estão agrupadas em divisões que se distinguem com base numa combinação de características que incluem pigmentos fotossintéticos, produtos de reserva, revestimento celular entre outros aspetos das células. Em alguns casos, a distinção das espécies só é possível através da análise de sequências de DNA ou análises detalhadas de pigmentos (Wehr *et al*, 2015).

1.1.1 Género *Vischeria* Pascher

O género *Vischeria* foi estabelecido em 1937 por Pascher, sendo a espécie lectótipo *Vischeria stellata* (Chodat ex Poulton) Pascher. É um género da família Eustigmataceae, Ordem Eustigmatales, Classe Eustigmatophyceae (Hibberd, 1981).

A classe Eustigmatophyceae é uma classe de algas verde-amareladas que foi separada da classe Xanthophyceae em 1971 por Hibberd & Leedale, com base em evidências citológicas e ultrastruturais, como a organização característica dos zoósporos, particularmente, o tamanho e forma do estigma, bem como a localização do aparelho flagelar (Santos, 1996). Esta separação também foi sustentada pelas diferenças na composição pigmentar do cloroplasto, já que esta classe se distingue da classe Xanthophyceae pela presença de uma combinação única

de pigmentos: clorofila *a,* β-caroteno, violaxantina e vaucheriaxantina-ester como principais xantofilas (Whittle & Casselton, 1975).

O género *Vischeria* é caracterizado por organismos com células de 7-20 µm de diâmetro, que podem apresentar forma esférica, poliédrica ou irregular com verrugas e projeções. Relativamente à reprodução, esta pode ocorrer por autósporos e por zoósporos uniflagelados (Ott *et al,* 2015). Este género foi inicialmente estabelecido para microalgas esféricas da classe Xanthophyceae, cujas paredes celulares possuíam poucas projeções arredondadas e um grande número de projeções cónicas. No entanto, em cultura, a grande maioria das células pode ter paredes sem ornamentação. Segundo Pascher, o género *Vischeria* estaria estreitamente relacionado com o género *Polyedriella*, caracterizado por espécies com células poliédricas, já que as diferenças entre as projeções de *Vischeria* e as verrugas de *Polyedriella* seriam consideradas pouco significativas. Mais tarde, a descrição de *V. punctata* por Vischer (1945) tornou a distinção entre os dois géneros ainda mais difícil e estudos posteriores demonstraram a sua similaridade (Hibberd & Leedale, 1971). Desta forma, o género *Vischeria* passou a englobar todas as eustigmatofíceas com células livres isométricas em que a parede celular seja ornamentada com projeções ou verrugas. Relativamente aos zoósporos, são uniflagelados e alongados, quase indistinguíveis dos do género *Eustigmatos* (Hibberd, 1981). O género é planctónico e pode ser encontrado em pântanos, lagos e riachos. Está também, frequentemente associado a espécies como *Sphagnum*, *Typha*, *Nuphar, Nymphea* e ciperáceas em águas onde a matéria orgânica dissolvida é abundante (Ott *et al*, 2015).

São reconhecidas 3 espécies dentro do género, nomeadamente *Vischeria helvetica* (Vischer & Pascher) D.J. Hibberd, *Vischeria punctata* Vischer e *Vischeria stellata* (Chodat ex Poulton) Pascher (Santos, 1996; Fawley *et al*, 2014).

Algumas espécies de *Vischeria* são boas produtoras de carotenoides, principalmente β-caroteno, violaxantina e vaucheriaxantina. No entanto, é a acumulação de β-caroteno que é responsável por mais de metade da quantidade total destes compostos (Li *et al*, 2012). Desta forma, estas microalgas poderão ser uma fonte natural promissora de carotenoides e o seu crescimento em fotobiorreator demonstra que podem produzir grandes quantidades de β-caroteno, que poderá ter diversas aplicações nutracêuticas (Li *et al*, 2012; Gao *et al*, 2015). O motivo pelo qual estas eustigmatofíceas acumulam grandes quantidades deste composto ainda não é claro, no entanto, como o β-caroteno possui diversas funções fisiológicas, é possível que estas sintetizem mais quantidade deste composto como proteção contra os danos

causados pelo stress do meio envolvente como, por exemplo, a depleção de nutrientes ou a luminosidade excessiva (Li *et al*, 2012).

Segundo um estudo recente, a espécie *Vischeria stellata* possui um perfil de ácidos gordos apropriado para a produção de biodiesel. A sua composição é semelhante à de outras eustigmatofíceas, tendo como principais constituintes os ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) e eicosapentaenoico (C20:5), que representam mais de 80% dos ácidos gordos totais (Gao *et al*, 2015).

1.1.1.1 *Vischeria helvetica* (Vischer & Pascher) D.J. Hibberd

A espécie *Vischeria helvetica* foi validamente publicada por Hibberd em 1981, sendo considerada sinónimo de *Polyedriella helvetica* Vischer & Pascher (Hibberd, 1981). Esta microalga é caracterizada pelas suas células esféricas a poliédricas, solitárias e livres com uma parede ornamentada com verrugas dispostas regularmente ou com dobras sinuosas (Bourrelly, 1981) (Figura 1). Em 1938, Pascher considerou que *P. helvetica* estaria estreitamente relacionada com *Vischeria*, já que as suas diferenças se resumiam a um pequeno número de células com forma poliédrica e algumas projeções da parede. Em 1945, Vischer, apontou *V. punctata* como um intermédio, em termos de forma celular, entre *Vischeria stellata* e *Polyedriella helvetica* e, mais tarde, *P. helvetica* passou a pertencer ao género *Vischeria* (Hibberd, 1981). Os plastos podem ser um ou mais em cada célula e são parietais (Bourrelly, 1981).

Nas mesmas condições de cultura, as células de *V. helvetica* são ligeiramente maiores do que *V. punctata* e *V. stellata*, mas são facilmente distinguidas pelo facto de o pirenóide ser particularmente bem diferenciado e geralmente maior (diâmetro 4,5-5 µm) do que *V. punctata* e *V. stellata* (Hibberd, 1981).

Como referido anteriormente, em termos da composição de carotenoides, esta microalga contém, principalmente, β-caroteno, violaxantina e vaucheriaxantina (Li *et al*, 2012). Esta microalga acumula grandes quantidades de carotenoides quando as condições de cultura incluem alta luminosidade, mantendo a percentagem de β-caroteno das condições de cultivo ótimas, mas é observado um aumento das percentagens de outros carotenoides como a zeaxantina, luteína, cantaxantina e astaxantina (Aburai *et al*, 2013).

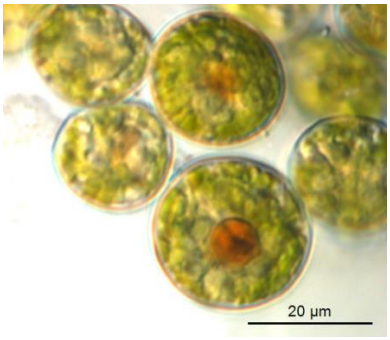


Figura 1: Células de *Vischeria helvetica*. DIC Prisma Nomarsky (Fotografia gentilmente cedida por R. Amaral).

1.1.2 Género *Asterococcus* Scherffel

O género *Asterococcus* foi estabelecido em 1908 por Scherffel, sendo que a espécie holótipo é *Asterococcus superbus* (Cienkowski) Scherffel. É um género da família Palmellopsidaceae, Ordem Chlamydomonadales e Classe Chlorophyceae (Leonardi *et al*, 2000).

Este género de algas verdes coloniais imóveis é caracterizado por apresentar um cloroplasto em forma de estrela e camadas gelatinosas em torno da célula e/ou colónia (Nakazawa *et al*, 2004). As células podem ser esféricas a elipsoidais com 10 a 40 µm de diâmetro, apresentam parede celular lisa, um só núcleo, um pirenóide central proeminente e, geralmente, dois vacúolos contráteis. Podem agrupar-se em 2-4-8-16 células, formando colónias esféricas a amorfas com as células dispersas num invólucro mucilaginoso. A reprodução assexuada é feita através de aplanósporos ou zoósporos, dispersos por dissolução da parede celular das células progenitoras. É um género de água doce, que tanto pode ser planctónico como bentónico (Shubert & Gärtner, 2015).

Atualmente são reconhecidas 5 espécies dentro do género nomeadamente, *Asterococcus superbus* (Cienkowski) Scherffel, *Asterococcus korschikoffii* Ettl, *Asterococcus papillatus* Nakazawa, *Asterococcus spinosus* Prescott e *Asterococcus limneticus* G. M. Smith (Nakazawa *et al*, 2004).

1.1.2.1 *Asterococcus korschikoffii* Ettl

Asterococcus korschikoffii é uma microalga de água doce caracterizada por células isoladas ou pequenas colónias, embebidas numa matriz mucilaginosa. As células vegetativas são imóveis, a sua parede celular é lisa e podem ter forma esférica a elipsoidal com, aproximadamente, 17-42 µm de comprimento e 15-42 µm de largura (Figura 2). O seu núcleo está posicionado na parte anterior do protoplasto, e os dois vacúolos contráteis na extremidade anterior da célula. O cloroplasto tem uma forma estrelada com lóbulos radiais, o pirenóide é único e central, quase esférico e por vezes de forma achatada, com as lamelas dos tilacoides penetrantes e dispostas radialmente, rodeadas por grânulos de amido (Nakazawa *et al*, 2004).

Em 1953, Korshikov descobriu uma colónia dendroide de *Asterococcus*, que identificou como *A. superbus*. Baseado nesta descrição, Ettl estabeleceu, em 1964, a espécie *A. korschikoffii* e caracterizou esta espécie como tendo colónias dendroides e camadas coloniais densas. Contudo, Ettl & Gärtner (1988) consideraram *A. korschikoffii* como sinónimo de *A. superbus* porque interpretaram a estrutura dendroide da matriz colonial como uma variante morfológica de *A. superbus* (Nakazawa *et al*, 2004).

Num estudo taxonómico para este género, feito por Nakazawa *et al*, e baseado na comparação da morfologia e sequência do gene *rbc*L, foram analisadas quatro estirpes de *A. korschikoffii* originárias da França e de Portugal (ACOI 238, ACOI 326, ACOI 961). Todas formam colónias dendroides notáveis com células grandes (17-42 µm de comprimento e 15-42 µm de largura) e com 15-25 lamelas dos tilacoides penetrantes na secção intermediária da matriz do pirenóide. Contrariamente, as outras espécies de *Asterococcus* observadas (*A. superbus* e *A. papillatus*) formam colónias esféricas com pequenas células (13-27 µm de comprimento e 11-27 µm de largura) e têm 5-15 lamelas dos tilacoides penetrantes na secção intermediária da matriz do pirenóide. Desta forma, *A. korschikoffii* é claramente diferenciado de *A. superbus* e de *A. papillatus* pela forma da colónia e pelo número de lamelas dos tilacoides no pirenóide, embora apresentem uma estrutura celular idêntica. Além disso, as sequências do gene *rbc*L vêm posicionar as estirpes de *A. korschikoffii* num grupo monofilético dentro do género *Asterococcus* (Nakazawa *et al*, 2004).

Figura 2: Célula de *Asterococcus korschikoffii*. DIC Prisma Nomarsky (Fotografia gentilmente cedida por R. Amaral).

Relativamente às suas camadas gelatinosas, estas vão aumentando distalmente e rompem, de maneira a libertar as camadas interiores mais jovens ou que contenham células vegetativas (Nakazawa *et al*, 2004). Assim sendo, as células podem ser solitárias ou agrupadas em colónias pela mucilagem que segregam, formando uma "cápsula" em torno destas (Figura 3). Esta mucilagem, dissolvida para o meio de cultura, é responsável pelo aumento da viscosidade do mesmo.

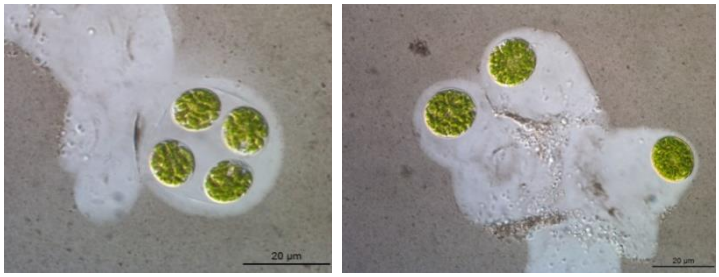


Figura 3: Libertação das células da estrutura colonial em *Asterococcus korschikoffii*. DIC Prisma Nomarsky (Fotografias gentilmente cedidas por R. Amaral).

1.2 Interesse biotecnológico das microalgas

A diversidade evolutiva e filogenética das microalgas reflete a grande variedade da composição química destes organismos, o que os torna extremamente atrativos para exploração como fontes comerciais de uma vasta gama de biomoléculas (Borowitzka, 2013).

Este fator, aliado ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala têm permitido que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas (Derner *et al*, 2006).

As aplicações comerciais das microalgas são, em grande parte, dominadas por *Arthrospira* (*Spirulina*)*, Chlorella, Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Spolaore *et al*, 2006). *Arthrospira platensis* é usada na nutrição humana devido ao seu excelente valor nutricional, sobretudo pelo elevado conteúdo proteico. Além disso têm-lhe sido apontados outros benefícios para a saúde como a redução da hiperlipemia, supressão da hipertensão, proteção contra insuficiência renal, promoção do crescimento de *Lactobacillus* intestinal e supressão dos níveis elevados de glicose no sangue. *Chlorella* pode ser usada como aditivo alimentar pois possui propriedades de ajuste de sabor e aroma. *Dunaliella salina* é explorada devido ao seu elevado conteúdo em β-caroteno, que pode atingir cerca de 14% do seu peso seco. É comercializada para nutrição humana em pó, como ingrediente para suplementos alimentares e alimentos funcionais pela empresa Cognis Nutrition and Health, sendo que esta é o seu maior produtor. *Aphanizomenon flos-aquae* é, de acordo com vários estudos, promotora de boa saúde em geral (Spolaore *et al*, 2006). A espécie *Haematococcus pluvialis* também é conhecida pela sua capacidade de produzir um pigmento muito interessante do ponto de vista comercial, a astaxantina (Pignolet *et al*, 2013).

Assim sendo, existem vários produtos derivados de microalgas bem estabelecidos no mercado, no entanto a descoberta de novos compostos gera a oportunidade de serem desenvolvidos novos produtos e comercializados (Borowitzka, 2013). Desta forma, o sucesso da biotecnologia das algas parece depender, maioritariamente, da escolha acertada da microalga, que deve apresentar propriedades específicas para as condições de cultivo que se possui e para o produto de interesse que se pretende obter (Pulz & Gross, 2004).

1.2.1 Lípidos das microalgas

Os lípidos constituem um grupo diversificado de compostos químicos que partilham a característica de serem insolúveis em água (Pignolet *et al*, 2013). O estudo destes compostos assumiu uma importância considerável a partir do momento em que se reconheceu que estão envolvidos em muitos processos biológicos vitais em animais, plantas e microrganismos. Os lípidos são as principais formas de armazenamento de energia em tecidos animais e vegetais e,

como componentes principais das membranas, são responsáveis por manter a integridade estrutural das células (Christie & Han, 2003; Pignolet *et al*, 2013).

O teor de lípido total em amostras biológicas é importante em muitos estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais e, geralmente inclui uma mistura de componentes com diferentes polaridades (Iverson *et al*, 2001). Desta forma, com base nas suas características físico-químicas, os lípidos podem ser divididos em dois grandes grupos: lípidos polares e lípidos não polares (Figuras 4 e 5).

Os lípidos polares incluem os fosfolípidos e os glicolípidos (Figura 4). Os fosfolípidos são os componentes principais da maioria das membranas, com exceção das membranas fotossintéticas de plantas, algas e de arqueobactérias, onde representam uma pequena fração dos lípidos membranares. Estes compostos apresentam ácidos gordos esterificados na posição 1 e 2 da molécula de glicerol mas o seu nome advém do grupo fosfato esterificado na posição 3 (Gurr *et al*, 2002). Representam 10-20% do lípido total nas algas, exceto em algumas espécies de dinoflagelados que podem ter uma percentagem mais elevada. Estes compostos são os componentes da membrana celular que mantêm a integridade estrutural e permeabilidade seletiva desta, sendo que os principais fosfolípidos encontrados nas algas são fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) (Kumari *et al*, 2013) (Figura 5). Por exemplo, os PG auxiliam os glicolípidos na manutenção da estabilidade do aparelho fotossintético e são os fosfolípidos dominantes nas algas verdes, representando 20-47% dos fosfolípidos. Nas algas vermelhas são os PC que representam mais de 60% destes compostos e nas algas castanhas tanto os PC como PE são dominantes e podem atingir 11,3% a 29,3% dos fosfolípidos (Kumari *et al*, 2013).

Relativamente aos glicolípidos, estes são encontrados em pequenas quantidades nos animais, no entanto são os principais constituintes das membranas fotossintéticas das algas e plantas. A sua estrutura é análoga à dos fosfolípidos mas com um açúcar ligado glicosidicamente na posição 3 da molécula de glicerol (Gurr *et al*, 2002). Os glicolípidos típicos das algas incluem monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG), sendo que o MGDG é restrito à membrana dos tilacoides enquanto o DGDG pode também ser encontrado nas membranas extraplastidiais (Kumari *et al*, 2013).

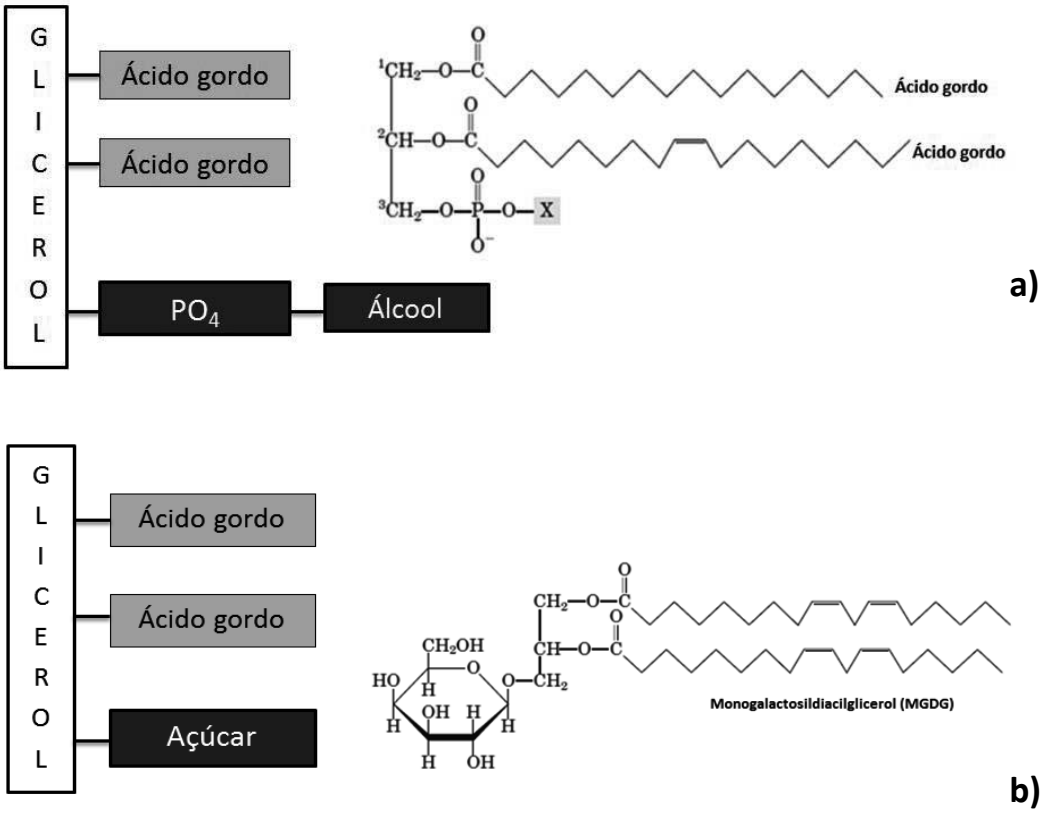


Figura 4: Esquema ilustrativo da estrutura geral dos fosfolípidos (a) e dos glicolípidos (b) (adaptado de Nelson & Cox, 2005).

Os lípidos não polares, também chamados lípidos neutros, incluem os hidrocarbonetos, as ceras esterificadas, os eicosanoides, os esteróis, os acilgliceróis e os ácidos gordos livres (Cohen, 1999). Os acilgliceróis são estéres de glicerol em que um, dois ou três grupos hidroxilo podem ser esterificados com ácidos gordos, correspondendo aos monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis (TAGs). Estes últimos constituem a maior parte de lípido neutro acumulado nas algas como produto de armazenamento e reserva de energia e podem apresentar uma percentagem altamente variável, entre valores de 1% e 97% (Becker, 2004; Hu *et al*, 2008; Huerlimann *et al*, 2010; Kumari *et al*, 2013). Os TAGs são sintetizados, essencialmente, durante o dia, armazenados em corpos lipídicos no citoplasma e reutilizados para a síntese de lípidos polares durante a noite (Kumari *et al*, 2013).

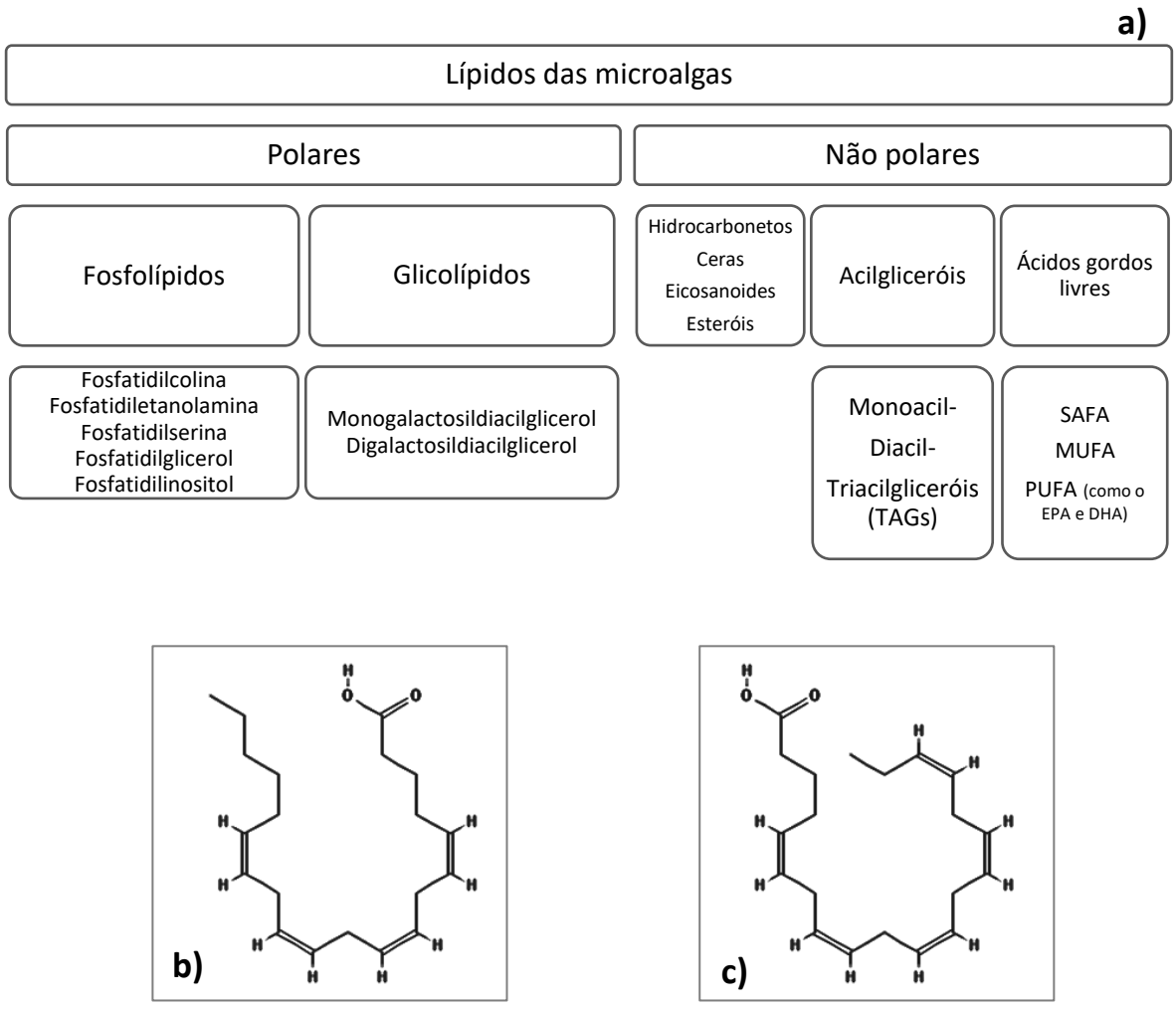


Figura 5: a) Diferentes classes de lípidos nas microalgas (adaptado de Cohen, 1999; Kumar *et al*, 2015). Estrutura química de dois ácidos gordos: b) ácido araquidónico (AA; C20:4 ω6); c) ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω3) (Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov);

Resumindo, a grande maioria do lípido total das algas é constituída por fosfolípidos, glicolípidos e lípidos neutros (Wainman *et al*, 1999). O grande interesse biotecnológico dos lípidos das microalgas reside nos ácidos gordos que podem diferir no comprimento da cadeia e no grau de saturação, sendo que alguns podem ser utilizados como biomarcadores de microrganismos em estudos ecológicos e outros podem ser estudados para utilização do ponto de vista nutricional (Parrish, 1999).

As microalgas sintetizam os ácidos gordos como blocos de construção para a formação de vários tipos de lípidos (Hu *et al*, 2008) e de acordo com o número de ligações duplas presentes na cadeia de ácidos gordos, estes podem ser classificados como ácidos gordos saturados (SAFAs, sem ligações duplas), monoinsaturados (MUFAs, com uma ligação

dupla) ou polinsaturados (PUFAs, com duas ou mais ligações duplas) (Hu *et al*, 2008; Kumari *et al*, 2013). Por regra, os SAFAs e MUFAs englobam a fração lipídica de reserva enquanto a fração lipídica estrutural é, em grande parte, composta por PUFAs (Pignolet *et al*, 2013). Além disso, os PUFAs podem ser classificados em Ω3 ou Ω6, dependendo da distância a que se encontra a última ligação dupla da extremidade metilo da cadeia de acilo. Os PUFA-Ω3 e Ω6 apresentam um grande interesse nutricional, uma vez que não são produzidos naturalmente pelo organismo humano e torna-se necessária a sua obtenção através da dieta (Kumari *et al*, 2013). Estes reduzem o colesterol (LDL), a pressão e viscosidade sanguínea, a agregação de plaquetas, a arritmia cardíaca e os níveis de triglicéridos no plasma, o que é benéfico para o sistema imunitário e importante na prevenção de doenças cardiovasculares (Huerlimann *et al*, 2010). Por estas razões, o interesse nos lípidos das microalgas tem sido direcionado para a produção de LC-PUFAs (ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa), como por exemplo o ácido araquidónico (AA; C20:4 Ω6), o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 Ω3) (Figura 5) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 Ω3) (Harwood & Guschina, 2009).

Os lípidos da maioria das algas são compostos, principalmente, por ácidos gordos saturados e monoinsaturados, no entanto as algas oleaginosas têm a capacidade de acumular ácidos gordos polinsaturados (PUFAs). Por exemplo, *Parietochloris incisa* acumula AA; *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum, Nitzschia laevis* e *Nannochloropsis* sp. acumulam EPA; *Pavlova lutheri* acumula tanto AA como EPA e *Isochrysis galbana* acumula DHA (Kumari *et al*, 2013). Os TAGs ricos em PUFAs atuam como reservas de ácidos gordos e auxiliam na biossíntese de lípidos polares, especialmente face a condições adversas, em que a síntese de PUFAs fica comprometida.

A capacidade que as algas têm para sobreviver a diversas condições ambientais reflete-se, em grande parte, na capacidade de modificar o seu metabolismo lipídico de forma eficiente face a essas alterações, isto é, os genes que codificam certas enzimas, tais como, lipases, fosfolipases, aciltransferases e várias sintetases de lípidos, são expressos de forma variável em ambientes diferentes mas também ao longo do crescimento (Nalder *et al*, 2015). Consequentemente, a diversidade de lípidos celulares existentes é enorme (Guschina & Harwood, 2006; Hu *et al*, 2008), o que torna as microalgas uma fonte alternativa e promissora para a produção de lípidos. As espécies ricas nestes compostos são denominadas espécies oleaginosas, e muitas podem ser induzidas a produzir lípidos e ácidos gordos específicos através da manipulação das propriedades físicas e químicas do meio de cultura. Estes organismos conseguem acumular quantidades substanciais de lípidos e esta acumulação está

associada ao consumo de açúcares a uma taxa superior à taxa de formação de células, o que promove a conversão do açúcar excedente em lípido (Araujo *et al*, 2013).

Tabela 1: Conteúdo e produtividade lipídica e de biomassa de algumas espécies de microalgas (adaptado de Mata *et al*, 2010).

Espécie	Conteúdo lipídico (% peso seco)	Produtividade lipídica (mg/L/dia)	Produtividade de biomassa (g/L/dia)
***Ankistrodesmus* sp.**	24,0-31,0	-	-
Botryococcus braunii	25,0-75,0	-	0,02
Chaetoceros muelleri	33,6	21,8	0,07
Chaetoceros calcitrans	14,6-39,8	17,6	0,04
Chlorella emersonii	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041
Chlorella sorokiniana	19,0-22,0	44,7	0,23-1,47
Chlorella vulgaris	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20
***Chlorella* sp.**	10,0-48,0	42,1	0,02-2,5
***Chlorococcum* sp.**	19,3	53,7	0,28
Dunaliella salina	6,0-25,0	116,0	0,22-0,34
***Dunaliella* sp.**	17,5-67,0	33,5	-
***Ellipsoidion* sp.**	27,4	47,3	0,17
Euglena gracilis	14,0-20,0	-	7,70
***Isochrysis* sp.**	7,1-33	37,8	0,08-0,17
Monodus subterraneus	16,0	30,4	0,19
***Nannochloropsis* sp.**	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-1,43
Nannochloropsis oculata	22,7-29,7	84,0-142,0	0,37-0,48
Neochloris oleoabundans	29,0-65,0	90,0-134,0	-
Pavlova salina	30,9	49,4	0,16
Pavlova lutheri	35,5	40,2	0,14
Phaeodactylum tricornutum	18,0-57,0	44,8	0,003-1,9
Porphyridium cruentum	9,0-60,7	34,8	0,36-1,50
Scenedesmus quadricauda	1,9-18,4	35,1	0,19
***Scenedesmus* sp.**	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26
***Skeletonema* sp.**	13,3-31,8	27,3	0,09
Skeletonema costatum	13,5-51,3	17,4	0,08
Tetraselmis suecica	8,5-23,0	27,0-36,4	0,12-0,32
***Tetraselmis* sp.**	12,6-14,7	43,4	0,30

A composição dos lípidos das microalgas pode depender das condições de cultivo, como composição do meio, fase de crescimento, intensidade luminosa, temperatura e fornecimento de nutrientes (Huerlimann *et al*, 2010; D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016). De todos os nutrientes, o azoto é um dos mais importantes para a regulação da acumulação de lípidos e a sua limitação, em algumas espécies de microalgas, pode fazer com que estas acumulem quantidades massivas de lípidos de reserva (Gao *et al*, 2015). O conteúdo total de lípidos nas microalgas pode variar, em média, entre 1 e 70% do seu peso seco, no entanto sob determinadas condições, algumas espécies podem atingir valores de 90% do seu peso seco, por exemplo, sob condições de escassez de nutrientes (Spolaore *et al*, 2006; Rodolfi *et al*, 2009; Mata *et al*, 2010) (Tabela 1). No entanto, as condições de *stress* podem aumentar a acumulação de lípidos mas isto, muitas vezes reduz a taxa de crescimento, o que indiretamente afeta a produtividade lipídica (Converti *et al*, 2009).

Algas com maior percentagem de lípido estão, normalmente, associadas a baixas produtividades de biomassa como por exemplo, o caso de *Botryococcus braunii* (Tabela 1). Alguns estudos também indicam que baixas percentagens de lípido podem ser associadas a elevadas percentagens de polissacarídeos, como no caso de *Porphyridium cruentum*, em que o aumento da produção de mucilagem, com consequente diminuição da produção de lípidos, se deve à limitação de nutrientes ao longo do envelhecimento da cultura, já que o carbono fixado fotossinteticamente é canalizado para a produção de exopolissacarídeos (Fábregas *et al*, 1998). Desta forma, durante a fase exponencial, a quantidade de polissacarídeos produzida é menor do que na fase estacionária (Metting, 1996; Banerjee *et al,* 2002).

Os lípidos das microalgas têm também sido utilizados como matéria-prima para a produção sustentável de biodiesel (Huerlimann *et al*, 2010). As vantagens do uso de microalgas em alternativa às plantas superiores como fonte de obtenção de óleos são várias. Por exemplo, o rendimento de óleo por cultura de microalga facilmente excede o rendimento das melhores plantas oleaginosas (Rodolfi *et al*, 2009). A produção de biodiesel a partir de microalgas requer a transesterificação dos triacilgliceróis (TAGs) em ésteres de ácidos gordos e a qualidade do produto é definida, maioritariamente, pelas características estruturais dos ácidos gordos (comprimento da cadeia, número de ligações duplas, ramificação da cadeia, etc.) (Huerlimann *et al*, 2010). Assim sendo, a composição dos ácidos gordos das diferentes microalgas tem um efeito significativo nas características do biodiesel produzido (Mata *et al*, 2010).

As microalgas verdes mais estudadas para a produção de biodiesel são clorófitas unicelulares, como *Auxenochlorella protethecoides*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Dunaliella salina* (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016). Estas apresentam um crescimento relativamente rápido, o que faz com que a sua produtividade lipídica seja superior à de microalgas de outras classes. No entanto, as euglenófitas e dinoflagelados têm potencial para serem usadas na produção de biodiesel, já que apresentam um conteúdo lipídico superior ao das algas verdes.

Aquando da escolha de microalgas para a produção de biodiesel devem ser considerados alguns aspetos como evitar usar espécies marinhas, pois estas contaminam o biodiesel com sódio e outros compostos inorgânicos, dando preferência a: (1) espécies extremófilas, já que são menos susceptíveis a contaminação por outros microrganismos; (2) espécies que produzam grandes quantidades de biomassa em pouco tempo; (3) espécies resistentes a condições de *stress* que induzam a produção de ácidos gordos, como a temperatura ou alterações de intensidade luminosa; (4) espécies que apresentem uma percentagem adequada de ácidos gordos saturados e insaturados; (5) espécies que produzam mais ácidos gordos do que os necessários para a produção de biodiesel, como por exemplo polinsaturados, que podem ser fracionados e depois vendidos (a parte mais saturada é usada para a produção de biodiesel) (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016).

1.2.1.1 Extração de lípidos

Nas últimas décadas, o aumento do interesse pelo biodiesel impulsionou a realização de muita investigação orientada para as técnicas de extração de lípidos, de maneira a obter altas taxas de rendimento nestes compostos (Kumari *et al*, 2013). Apesar da identificação e quantificação precisa dos compostos lipídicos ser um pré-requisito para a sua potencial utilização e exploração, a extração de lípidos é um fator essencial a ter em conta neste processo (Kumari *et al*, 2013).

Esta etapa continua a ser um desafio significativo para a produção comercial de óleo de microalgas (Li *et al*, 2014). Um dos principais obstáculos associados à produção de lípidos por microalgas é a dificuldade em extraí-los da sua localização intracelular de uma forma eficiente e económica, evitando também o uso de grandes volumes de solvente. Um requisito

fundamental é que o óleo seja libertado e extraído sem contaminações significativas de outros componentes celulares, como DNA ou clorofila *(Scott et al*, 2010). Assim sendo, têm sido aplicados inúmeros métodos para a extração de lípidos em microalgas, nomeadamente métodos mecânicos, métodos de extração com solventes e métodos de extração com fluidos supercríticos (Harun *et al*, 2010) (Tabela 2).

Os métodos de extração mecânicos representam uma abordagem eficaz pois não são dependentes do tipo de espécies de microalgas a ser processado e também são menos susceptíveis de contaminação do produto lipídico extraído. No entanto, estes métodos requerem um gasto energético elevado e a geração de calor pode provocar danos nos produtos finais. O método de compressão mecânica é um dos métodos mais simples e antigos usados para extrair óleos de sementes e pode também ser usado no caso das microalgas. O princípio desta técnica baseia-se em aplicar uma pressão mecânica elevada para esmagar e quebrar as células, libertando o óleo para o exterior (Kumar *et al*, 2015). Apesar deste método extrair quase 75% do óleo, é considerado um dos menos efetivos já que é um processo lento e que requer secagem da biomassa algal (Harun *et al*, 2010). Além disso, a sua maior desvantagem é a possível presença de pigmentos no óleo, que têm de ser removidos ou por extração com solventes ou por adsorção com carbono ativado, o que faz com que os custos do processo se elevem (Kumar *et al*, 2015). Outro exemplo de método mecânico utilizado é o moinho de esferas, em que a biomassa é colocada junto a esferas muito pequenas de vidro, ou de outro material, dentro de um agitador. O choque físico entre as esferas e as células resulta na rutura da parede celular, libertando todo o conteúdo celular (Kumar *et al*, 2015). Por fim, outro método mecânico é o uso de ultrassons, uma técnica alternativa em que as microalgas são expostas a ondas ultrassónicas de alta intensidade, que criam bolhas de cavitação em torno das células. Quando as bolhas colapsam emitem ondas de choque que destroem a parede das células, de modo que os compostos interiores sejam libertados. Este método pode também ser usado com solventes orgânicos de maneira a aumentar a libertação de conteúdos celulares no meio (Harun *et al*, 2010).

Tabela 2: Diferentes métodos de extração de lípidos e as suas vantagens e desvantagens (adaptado de Harun *et al*, 2010; Mubarak *et al*, 2015; Kumar *et al*, 2015).

Método de extração	Princípio da técnica	Vantagens	Limitações
1. Métodos mecânicos: - Pressão mecânica - Moinho de esferas - Ultrassons	Rebentamento celular	Fácil de usar; não há solventes envolvidos	Grande quantidade de biomassa; grande consumo de energia; difícil aumentar de escala
2. Extração com solventes: - Soxhlet	Sem rebentamento; penetração dos solventes	Alta eficiência; solventes usados pouco dispendiosos; fácil de reproduzir	Solventes inflamáveis e/ou tóxicos; requer grande quantidade de solvente; processo de recuperação do solvente caro;
3. Extração supercrítica	Penetração do fluido supercrítico	Rápido; não-tóxico (solvente "verde"); não inflamável e simples de operar	Interação insuficiente entre CO_2 supercrítico e amostra; falha em extrações em matrizes sólidas; dispendioso

A extração com solventes orgânicos (como o benzeno, hexano, acetona, clorofórmio, etc.) é um método que apresenta grande eficiência. Estes solventes penetram na parede celular das microalgas e extraem o lípido, porque este possui uma elevada solubilidade neste tipo de solventes. O extrato pode depois ser sujeito a processos de destilação para separar o lípido do solvente (Harun *et al*, 2010). O solvente ou mistura de solventes utilizados devem ser suficientemente polares para remover os lípidos dos seus constituintes celulares mas não demasiado, pois também é necessário solubilizar os TAGs e outros lípidos não polares (Kumari *et al*, 2013). Um solvente adequado deve ser insolúvel em água, solubilizar preferencialmente os compostos de interesse, ter um ponto de ebulição baixo para facilitar a sua remoção após a extração e ter uma densidade consideravelmente diferente da água (Mercer & Armenta, 2011).

Vários solventes orgânicos ou combinação de diferentes solventes têm sido utilizados para a extração de lípidos. O método de Folch (Folch *et al*, 1957) é o método mais antigo, que

criou a base para o desenvolvimento de protocolos posteriores. Neste método são usados dois solventes, nomeadamente, clorofórmio e metanol, 2:1 (v/v) para a extração de lípidos das células e esta mistura resulta em duas fases, sendo que os lípidos ficam na fase superior. Este método permite um processamento rápido e fácil de um grande número de amostras, no entanto é menos sensível quando comparado com outros métodos (Kumar *et al*, 2015). Outra metodologia semelhante à de Folch é a de Bligh and Dyer, desenvolvida em 1959 e que difere um pouco da anterior, já que a razão de clorofórmio-metanol é de 1:2 (v/v). Este método é muitas vezes aplicado com várias modificações de maneira a melhorar determinados aspetos (Kumari *et al*, 2013; Kumar *et al*, 2015).

Um aparelho que foi desenvolvido para a extração de lípidos com solventes orgânicos é o Soxhlet (Figura 6), desenvolvido por Franz Von Soxhlet em 1879 e considerado uma técnica *standard* há mais de um século. Este aparelho contém uma câmara de extração, onde é colocada a amostra envolta em papel de filtro, ficando entre um balão de destilação (que contém o solvente) e um condensador (onde há fluxo de água para arrefecimento). Quando a manta de aquecimento é ligada, o solvente evapora, atinge o condensador e é forçado a condensar, gotejando sobre a amostra, o que faz solubilizar os compostos a serem extraídos. Quando o solvente atinge o nível do sifão, este transborda e a amostra, diluída no solvente, é despejada sobre o balão de destilação. Este processo é repetido até ao fim da extração (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

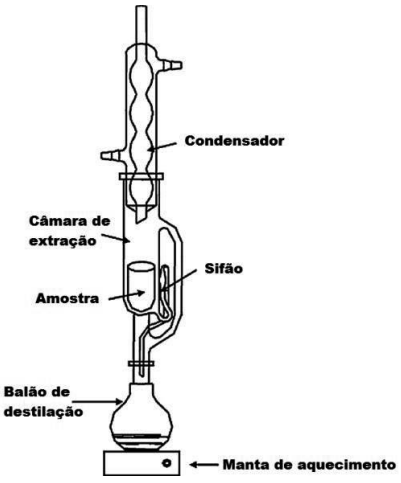


Figura 6: Esquema ilustrativo de um sistema convencional de Soxhlet (adaptado de Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

Outro método que tem ganho aceitação nos últimos anos é o uso de fluidos supercríticos para extrair produtos de interesse de microalgas. Isto porque se obtêm extratos

altamente purificados, livres de resíduos de solventes e o tempo de extração e separação é relativamente rápido (Mercer & Armenta, 2011). A extração supercrítica envolve o uso de substâncias que possuem propriedades de líquidos e gases (por exemplo, CO_2) quando expostos a temperaturas e pressões críticas. Esta particularidade permite que funcionem como solvente de extração, sem deixar resíduos quando o sistema volta à pressão atmosférica e à temperatura ambiente (Harun *et al*, 2010). O dióxido de carbono é muito usado devido à sua baixa temperatura crítica (31,1 °C) e pressão (72,9 atm). Além disso, trata-se de um gás à temperatura ambiente que é facilmente removido no fim da extração, não é tóxico, não é inflamável, é pouco dispendioso e pode ser seguramente reciclado, o que o torna um solvente ambientalmente benéfico (Mercer & Armenta, 2011).

A nível industrial, o processo de extração de óleo a partir de microalgas é realizado, geralmente com disrupção celular mecânica, seguida de extração química com solventes (Ferrentino & Farag, 2006). A eficiência de um método de extração de lípidos, muitas vezes está associada à espécie de microalga usada e as diferenças observadas podem ser explicadas pelo tamanho da alga e composição da sua parede celular (Li *et al*, 2014).

Segundo Kumar *et al* (2015), o método mais recente e rigoroso para a extração de todas as classes de lípidos é o desenvolvido por Matyash *et al* (2008), que é uma modificação dos métodos de Folch/Bligh and Dyer. O solvente utilizado é o éter metil *t*-butílico (MTBE) e, segundo o mesmo autor, este método fornece os perfis lipídicos mais precisos, além de ser aplicável a todos os tipos de células que contenham lípidos, nas quais se incluem as microalgas.

A análise dos perfis de lípido total, bem como a existência de diferentes ácidos gordos em diferentes classes lipídicas de microalgas tem-se revelado uma área emergente e que se espera venha a identificar novos ácidos gordos com uma variedade de novos grupos funcionais (Lang *et al*, 2011).

1.3 Cultivo de microalgas para exploração de compostos

As microalgas que são usadas há seculos por populações indígenas na alimentação, incluem espécies como *Nostoc, Arthrospira* (*Spirulina*) e *Aphanizomenon* (Spolaore *et al*, 2006). Por exemplo, o lago Chade, em África ou o lago Texcoco, no México constituíam uma fonte de *Spirulina* para as pessoas que viviam nessas áreas. No entanto as primeiras tentativas de

cultivo em tanques abertos são atribuídas aos alemães durante a segunda guerra mundial. Nessa altura, as algas foram cultivadas principalmente como suplementos alimentares. Nos anos 70, a produção comercial de algas foi iniciada na Europa de Leste, Israel e Japão, sendo as algas cultivadas em tanques abertos para uso como alimento saudável. De facto, o propósito do cultivo de algas tem ido de encontro às necessidades específicas das populações. Por exemplo, nos Estados Unidos, os sistemas de cultivo a céu aberto foram desenvolvidos para o tratamento de águas residuais (Ugwu *et al*, 2008).

Com o passar do tempo, a biomassa algal tornou-se muito importante no campo da aquacultura e recentemente tem recebido muita atenção pois os seus produtos metabólicos podem ter diversas aplicações em indústrias, como a alimentar, cosmética ou farmacêutica (Borowitzka, 1999; Ugwu *et al*, 2008). Podem ser usadas como alimento para outros organismos, marinhos e terrestres, suplementos alimentares ou ainda serem usadas para processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização de solos, biocombustíveis e fitorremediação de resíduos tóxicos (Perez-Garcia *et al*, 2011). Deste modo, há um mercado em expansão que enfrenta um novo desafio de cultivar algas em larga escala, sem prejudicar o ambiente (Cardozo *et al*, 2007).

A exploração comercial em larga escala começou no Japão com o cultivo de *Chlorella*, sendo que em 1980 já existiam 46 unidades de fabrico em larga escala na Ásia, produzindo mais de 1000 kg desta microalga por mês (Spolaore *et al*, 2006). Atualmente, considerando todos os produtos derivados de microalgas, a produção das espécies *Spirulina* e *Chlorella* é a maior, apenar de concentrada apenas em algumas empresas, maioritariamente da Ásia e EUA. O volume de produção global estimado de *Spirulina* e *Chlorella* é de 5000 e 2000 toneladas de matéria seca por ano, respetivamente, e os valores de produção rondam os 40 milhões de dólares cada ano (Vigani *et al*, 2015).

São várias as aplicações das microalgas desde a nutrição humana e animal aos cosméticos e à produção de compostos de grande valor como pigmentos, ácidos gordos, etc. (Tabela 3). As principais espécies com interesse comercial cultivadas são *Chlorella* e *Spirulina* para alimentação humana, *Dunaliella salina* como fonte de β-caroteno, *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina e várias outras espécies em aquacultura (Borowitzka, 1999).

Tabela 3: Produção anual de algumas microalgas com interesse comercial e as suas principais aplicações (adaptado de Spolaore *et al*, 2006; Vigani *et al*, 2015).

Alga	Produção anual (toneladas de peso seco)	País produtor	Produtos e aplicações
Spirulina	5000	China, Índia, EUA, Birmânia, Japão	Nutrição humana e animal, cosmética, ficobiliproteínas
Chlorella	2000	Taiwan, Alemanha, Japão	Nutrição humana, aquacultura e cosmética
Dunaliella salina	1200	Austrália, Israel, EUA, China	Nutrição humana, cosmética e β-caroteno
Aphanizomenon flos-aquae	500	EUA	Nutrição humana
Haematococcus pluvialis	300	EUA, Índia, Israel	Aquacultura, astaxantina

O método de cultivo é um fator a ter em conta quando o objetivo é a comercialização sendo que, fatores como a biologia da microalga, custos energéticos, disponibilidade de água, custo de nutrientes, condições ambientais e tipo de produto final devem ser avaliados. Os sistemas de cultivo em grande escala devem ter em conta vários indicadores como a eficiência na utilização da luz, o controlo da temperatura, o *stress* hidrodinâmico do sistema de cultivo, a capacidade ou necessidade de manter as culturas unialgais e a viabilidade do aumento de escala (Borowitzka, 1999).

Quando se pretende desenvolver uma produção de microalgas, o ponto de partida mais adequado será a seleção de uma estirpe comercialmente interessante. Esta seleção é, normalmente, realizada em pequenos volumes de culturas de laboratório e é nesta fase que são feitos estudos preliminares de maneira a conhecer o tipo de crescimento da alga e a otimizar as condições de cultura, as análises de composição química da biomassa, bem como o desenvolvimento de métodos de análise de compostos e procedimentos de extração. Depois de selecionada a estirpe e de ser conhecida a sua *performance* de cultivo à escala laboratorial, caso se revele interessante do ponto de vista comercial, o passo seguinte será o aumento de escala até se atingir uma produção de larga escala da estirpe e, por conseguinte, do composto. Por outro lado, quando o composto de interesse produzido pelas microalgas é, de alguma forma, libertado para o meio, poderá ser ponderada a possibilidade de cultivo em sistemas fechados, para um melhor controlo quer dos parâmetros de cultivo, quer da assepsia (Carvalho *et al*, 2014).

Durante o século XX, os investigadores e produtores comerciais desenvolveram diversas tecnologias de cultivo para a produção de biomassa microalgal e, atualmente, os sistemas de cultivo de larga-escala em funcionamento são os *raceway ponds* ou lagoas a céu aberto (sistemas abertos) e os fotobiorreatores fechados, cada um com as suas vantagens e desvantagens (Guedes & Malcata, 2012; Olaizola, 2003).

1.3.1 Sistemas abertos

Os *raceway ponds* são sistemas a céu aberto, que foram desenvolvidos nos anos 50 por W. J. Oswald (Chisti, 2013; Fernández *et al*, 2013) (Figura 6). O uso destes sistemas abertos como método de cultivo de microalgas é comum e, atualmente existem várias companhias mundiais a produzir biomassa em larga escala nestes sistemas. São compostos por um canal de circulação com, geralmente, 0,3m de profundidade, onde o material é misturado e posto a circular através da ação de uma roda de pás (Figura 7). O fluxo é conduzido ao longo do canal por defletores estrategicamente colocados. Os canais podem ser construídos em betão, ou terra compactada e podem ser revestidos com plástico branco. Durante o dia, a cultura é alimentada continuamente junto à roda de pás e colhida antes desta, após a conclusão do circuito de circulação. A roda de pás trabalha continuamente de maneira a evitar a sedimentação (Chisti, 2007) (Figura 7).

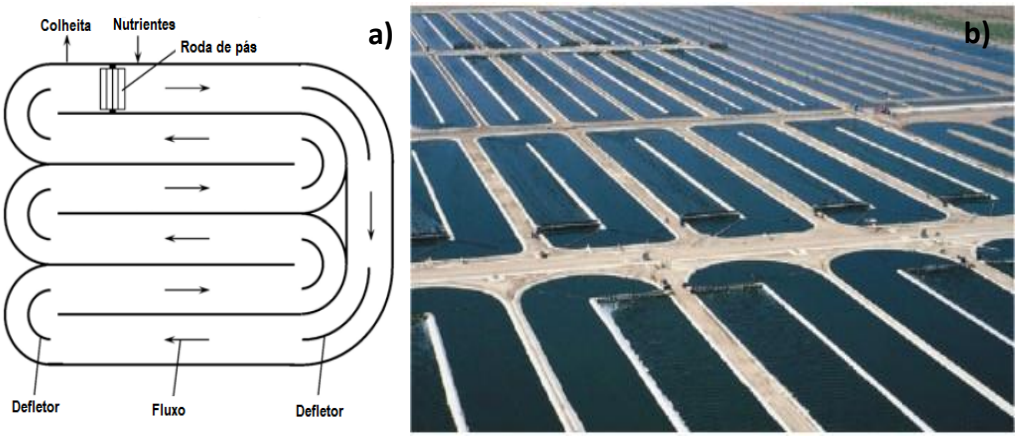


Figura 7: a) Esquema ilustrativo do funcionamento dos *raceway ponds* (Chisti, 2007). b) Sistema *raceway* na Califórnia (Copyright IEAGHG.org, 2013).

1.3.2 Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores podem ser definidos como sistemas fechados de cultivo em que não há troca direta de gases, como o CO_2, O_2 ou H_2O nem de contaminantes entre a cultura e a atmosfera (Fernández *et al*, 2013). Os fotobiorreatores permitem, essencialmente, o cultivo de uma única espécie de microalga por um período de tempo prolongado e têm sido usados com sucesso para a produção de grandes quantidades de biomassa microalgal (Chisti, 2007).

Os principais tipos de fotobiorreatores fechados são os fotobiorreatores de coluna vertical, de superfície plana e tubulares (Figura 8). Estes últimos são considerados mais apropriados para cultivo no exterior (Harun *et al*, 2010) e podem apresentar variações como tubular horizontal, inclinado, vertical, espiral, cónico ou helicoidal (Carvalho *et al*, 2014). Embora tenham sido descritos vários tipos de fotobiorreatores, apenas uma pequena porção permite utilizar a energia solar de forma eficiente para a produção de biomassa, por isso vários investigadores continuam a propor novas configurações de maneira a aumentar a produtividade e reduzir os custos de produção. Os fotobiorreatores podem ter várias configurações e modos de operação, no entanto, apenas alguns são usados em tamanho industrial, como é o caso dos tubulares e de superfície plana com capacidade até 1000 L (Ugwu *et al*, 2008; Carvalho *et al*, 2014). A maioria dos fotobiorreatores é caracterizada pela grande superfície exposta à iluminação. O princípio fundamental nestes reatores é reduzir a trajetória da luz e assim, aumentar a quantidade de luz disponível para cada célula (Borowitzka, 1999).

Figura 8: Principais tipos de fotobiorreatores fechados; a) Fotobiorreator de coluna vertical (NanoVoltaics, Inc.); b) fotobiorreator de superfície plana; c) fotobiorreatores tubulares (IGV Biotech).

Os aspetos mais importantes a ter em conta na projeção de um fotobiorreator incluem a iluminação, a forma de homogeneizar, o consumo de água e de CO_2, a forma de remoção do O_2, o fornecimento de nutrientes, a manutenção da temperatura, o material de construção e a limpeza (Carvalho *et al*, 2014).

1.3.3 Sistemas abertos *versus* fotobiorreatores fechados

É de salientar que se torna difícil definir um sistema de cultivo como melhor que outro dado que ambos apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 4). O alvo comercial, a localização geográfica e o metabolito a ser produzido irão ser fundamentais para determinar a escolha: cultura axénica ou não-axénica, cultura intensiva ou extensiva, *raceway ponds* ou fotobiorreatores (Fernández *et al*, 2013).

Os sistemas abertos apresentam uma grande vantagem a nível económico, já que a sua construção e forma de operar os tornam relativamente baratos, enquanto os sistemas fechados se revelam mais dispendiosos e, por vezes, de difícil manuseamento. Além disso também são mais económicos do ponto de vista energético, já que têm um baixo consumo de energia. No entanto, os sistemas abertos têm uma baixa produtividade de biomassa quando comparados com os fotobiorreatores. Nestes sistemas apenas é possível cultivar um grupo restrito de espécies de microalgas, pois é muito difícil controlar as condições de cultivo, tendo em conta que as culturas estão sujeitas a fatores externos. (Borowitzka, 1999; Chisti, 2007; Ugwu *et al*, 2008; Fernández *et al*, 2013). Por exemplo, a temperatura oscila dentro de um ciclo diurno e sazonal e a perda de água por evaporação pode ser significativa. Devido a estas perdas significativas para a atmosfera, estes sistemas utilizam o dióxido de carbono de maneira menos eficiente do que fotobiorreatores. Além disso, a produtividade pode ser afetada por contaminações de espécies de algas indesejadas e/ou microrganismos que se alimentam de algas (Chisti, 2007). Esta contaminação poderia ser controlada através da instalação dos tanques dentro de estufas, mas isso torna-se impraticável para grandes produções, como as necessárias para a produção de biocombustíveis (Chisti, 2013). Uma outra solução poderá passar por selecionar espécies que crescem em meios altamente seletivos, ou seja, que apresentem uma característica que dificulte o crescimento de outros organismos como, por exemplo, *Dunaliella salina*, que cresce com salinidade muito elevada, ou *Spirulina*, que cresce em ambientes com grandes concentrações de bicarbonato e pH elevado (Borowitzka, 1999; Carvalho *et al*, 2014).

Tabela 4: Comparação dos métodos de cultivo (adaptado de Harun *et al*, 2010).

Fator	Sistemas abertos	Fotobiorreatores
Espaço requerido	Muito	Pouco
Perda de água	Muito alta	Baixa
Perda de CO_2	Alta, dependendo da profundidade do tanque	Baixa
Concentração de O_2	Baixa, devido à contínua desgaseificação espontânea	Construção implica dispositivo de troca de gases
Temperatura	Altamente variável	Requer arrefecimento
Risco de contaminação	Elevado	Reduzido
Evaporação	Elevada	Nenhuma
Qualidade da biomassa	Variável	Reprodutível
Custo de colheita	Elevado	Baixo
Segurança microbiológica	Nenhuma	UV
Requisito energético	4000 W	1800 W

Os fotobiorreatores permitem um maior controlo da maioria dos parâmetros de cultivo comparativamente aos sistemas abertos e essa é a sua principal vantagem (Harun *et al*, 2010). Desta forma, permitem o cultivo de culturas axénicas, ou seja, não contaminadas ou livres de quaisquer outros organismos, durante períodos prolongados, o que possibilita o cultivo de um número superior de espécies. Tendo em conta que há um maior controlo das condições de cultura, o produto final apresenta uma qualidade maior e uma composição mais consistente, para além de a produtividade também ser superior (Borowitzka, 1999; Harun *et al*, 2010). Além disso, este tipo de sistemas tem tido um papel importante no aumento da diversidade de espécies de algas que podem ser cultivadas, em especial estirpes sensíveis e potencialmente valiosas na produção de compostos bioativos. Como referido anteriormente, a possibilidade de controlar os parâmetros de cultura pode permitir que a composição bioquímica seja modificada através da alteração das variáveis de funcionamento do sistema, o que se torna especialmente útil para a produção de compostos interessantes do ponto de vista biotecnológico, tais como ácidos gordos polinsaturados, polissacarídeos, antioxidantes, alimentos para a aquacultura, entre outros (Fernández *et al*, 2013).

Face às vantagens e desvantagens referidas, já foram desenvolvidos alguns sistemas mistos em que há a combinação de fotobiorreatores com sistemas a céu aberto, sendo o cultivo feito em duas etapas. A primeira etapa ocorre num fotobiorreator, onde é produzido o inóculo e a segunda fase ocorre num tanque para se obter o produto de interesse, quer seja biomassa ou, por exemplo, óleo. Tendo em conta que a segunda parte do cultivo é de curta duração, não haverá tempo para o desenvolvimento e prevalência de organismos contaminantes (Rodolfi *et al*, 2009).

1.4 Culturas mistas

Culturas mistas de microrganismos são comuns nos sistemas ecológicos naturais. Começaram por ser utilizadas para tratamento de materiais residuais industriais ou resultantes da agricultura, com a vantagem de poderem produzir compostos bioativos interessantes. Numa cultura mista, duas ou mais espécies de microrganismos pré-selecionados são cultivados sincronicamente no mesmo meio, onde podem explorar atividades metabólicas complementares para sobreviver, crescer e se reproduzir (O'Reilly & Scott, 1995). Vários microrganismos têm sido usados no estudo de culturas mistas nomeadamente, bactérias, fungos e algas, já que muitos destes organismos são capazes de metabolizar vários tipos de compostos. Contudo, face aos problemas associados, como a competição, predação e parasitismo, tem sido dada preferência a espécies com condições de cultura semelhantes (pH, temperatura, nutrientes e nível de oxigénio) e, muitas vezes, a espécies que sejam encontradas juntas naturalmente (O'Reilly & Scott, 1995).

No caso das microalgas, os estudos com tratamento de águas residuais basearam-se, durante muito tempo, no uso de monoculturas para remover um nutriente específico (na sua maioria azoto ou fósforo). No entanto, como a maioria das águas de tratamento contém uma variedade de nutrientes difíceis de remover por uma só espécie, começaram a surgir estudos com culturas mistas de microalgas (Gantar *et al*, 1991).

Atualmente, para além do tratamento de águas residuais, a exploração comercial das microalgas foca-se essencialmente no cultivo em grande escala de espécies individuais com alto rendimento lipídico ou com outras características desejadas (Novoveská *et al*, 2016). No entanto, com exceção das espécies extremófilas, as monoculturas dificilmente resistem à contaminação por outras algas ou microrganismos, particularmente em sistemas abertos

comuns. Além disso, a produção de biomassa ainda enfrenta alguns problemas relacionados com a viabilidade do processo e a baixa produtividade atingida. Desta forma, têm sido feitos alguns estudos com culturas mistas, de forma a promover a produtividade de biomassa e de lípidos, bem como a remoção de nutrientes do meio de cultura (Gonçalves *et al*, 2016). Phatarpekar *et al* (2000) avaliaram o desempenho de crescimento e bioquímica celular de uma cultura mista de *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* em comparação com a sua monocultura. Johnson & Admassu (2012) estudaram as produtividades de biomassa e lipídica de monoculturas e culturas mistas de *Chlorococcum* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Phaeodactylum tricornutum*. Brito *et al* (2013) investigaram o efeito de diferentes meios de cultura na produção de biomassa e de pigmentos de *Chlorella vulgaris* e *Hyaloraphidium contortum.* Um outro estudo com *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. avaliou a eficiência na remoção de azoto e fósforo do meio de cultura em comparação com as respetivas monoculturas (Koreivienė *et al*, 2014). Mingazzini & Palumbo (2015) utilizaram um método de contagem eletrónica para monitorizar a cultura mista de *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum.* Outro estudo com *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. foi feito para comparar a densidade celular, taxa de crescimento e a sua composição em monocultura e cultura mista (Arkronrat *et al*, 2016). Gonçalves *et al* (2016) estudaram co-culturas de *Chlorella vulgaris, Pseudokirchneriella subcapitata* e *Microcystis aeruginosa* com *Synechocystis salina* para avaliar a produção de biomassa, de lípidos e a remoção de azoto e fósforo do meio de cultura. De um modo geral estes autores concluem que as culturas mistas, em relação aos parâmetros avaliados, são mais eficientes que as respetivas monoculturas. Novoveská *et al* (2016) avaliaram a possibilidade de estabilizar culturas mistas através da manipulação das condições ambientais, como por exemplo a salinidade. É de salientar que existem alguns artigos que utilizam o termo cultura mista para designar culturas mistas selvagens, isto é, uma amostra de material de um lago e avaliam o seu potencial na produção de biodiesel (Sathish *et al*, 2012).

As culturas de espécies complementares oferecem várias vantagens para o cultivo de biomassa algal, como uma maior eficiência no uso dos recursos, maior resistência a contaminações de outros organismos e maior estabilidade face a condições abióticas variáveis (Gonçalves *et al*, 2016; Novoveská *et al*, 2016). Por exemplo, no caso de duas microalgas, uma com um crescimento elevado em condições de baixa luminosidade e outra que cresça mais depressa em condições de alta luminosidade, uma cultura mista das duas será um intermédio dos dois casos. Se um produtor de algas soubesse que o tempo estaria, predominantemente, nublado iria produzir uma monocultura da primeira, mas se soubesse que estaria muito

ensolarado, escolheria a segunda. Se não souber como é que o tempo vai estar, seria mais vantajoso fazer crescer uma cultura mista de maneira a cobrir as duas situações (Johnson & Admassu, 2012).

Os estudos experimentais com o objetivo de explorar o potencial biotecnológico das culturas mistas ainda são poucos e muitos dos estudos desenvolvidos com este tipo de sistemas têm, principalmente, uma perspetiva ecológica, pois a relação entre a diversidade de espécies e o funcionamento do ecossistema é um assunto debatido há décadas. Apesar de começar a surgir um consenso de que a diversidade aumenta a produtividade e estabilidade nas comunidades de organismos superiores, ainda pouco se sabe sobre estas relações em comunidades de fitoplâncton (Ptacnik *et al*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado relações positivas entre a diversidade microalgal natural e o uso eficiente de recursos (fósforo, nitratos) em comunidades de água doce e salobras (Ptacnik *et al*, 2008; Cardinale, 2011). As comunidades de algas com maior riqueza de espécies fazem melhor uso das oportunidades de nicho no ambiente, o que permite a captura de uma maior proporção de recursos disponíveis (Cardinale, 2011). Esta relação diversidade-produtividade positiva pode ser explicada por, pelo menos, dois mecanismos. Um deles é o efeito de seleção, em que uma espécie altamente produtiva, dentro de um conjunto de espécies, tem uma maior probabilidade de, ao ser incluída num outro conjunto mais diverso, aumentar a produtividade geral da comunidade. Outro mecanismo proposto é o efeito de complementaridade, em que uma variedade de espécies preenche melhor o nicho disponível do que quaisquer espécies individuais, conseguindo uma utilização altamente eficiente dos nutrientes disponíveis e, consequentemente, um aumento global da produtividade (Striebel *et al*, 2009; Nalley *et al*, 2014). No entanto, outros estudos de comunidades naturais e artificiais também demonstram uma relação diversidade-produtividade negativa, na qual as monoculturas atingem produtividades maiores do que as culturas mistas, o que sugere a importância das características das espécies, mais do que apenas o número de espécies ou as condições (Nalley *et al*, 2014).

Para o estudo desta relação diversidade-produtividade é necessário considerar, para além do número de espécies, a diversidade de taxa de nível superior ao género. Nas comunidades de microalgas, os grupos taxonómicos como a classe ou o filo, geralmente separam os organismos com base em características fisiológicas e bioquímicas. Desta forma, promover a riqueza de espécies como uma medida de diversidade pode resultar num conjunto constituído por representantes de um único grupo taxonómico de ordem mais elevada e,

consequentemente, à sobreposição de características fisiológicas (pigmentos semelhantes, requisitos nutricionais), reduzindo a possibilidade do uso de recursos complementares (Nalley *et al*, 2014). Num estudo de Stockenreiter *et al* (2013), em que foram utilizadas 23 estirpes de microalgas de alguns grupos taxonómicos diferentes (Chlorophyta, Bacillariophyta, Cyanophyta e Chrysophyta), não se registou qualquer aumento no conteúdo lipídico em culturas mistas compostas por espécies do mesmo grupo. No caso das diatomáceas, observou-se até uma ligeira diminuição do teor de lípidos. Pelo contrário, em culturas mistas constituídas por representantes de diferentes grupos, registou-se um aumento da produção de lípidos (Stockenreiter *et al*, 2013), o que reforça a possibilidade de a presença de espécies de grupos taxonómicos diferentes ser favorável para a utilização de recursos e, consequentemente, para a produtividade (Nalley *et al*, 2014).

Começam a surgir cada vez mais estudos sobre esta temática, numa fase em que a biotecnologia algal tem recebido muita atenção. No entanto, é necessária mais investigação para se determinar as associações de microalgas ideais para as condições ambientais locais, tendo em vista o aumento de escala para níveis industriais (Nalley *et al*, 2014).

1.5 Contextualização e Objetivos

A Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) é uma unidade de investigação que inclui a maior coleção de microalgas de água doce a nível mundial, com cerca de 4000 estirpes diferentes e que constitui um recurso científico único de biodiversidade (Santos & Santos, 2004). Iniciou-se para fins pedagógicos e para o estudo da taxonomia das microalgas, através de métodos clássicos com base em microscopia que hoje em dia são complementados pelos métodos moleculares (Amaral *et al*, 2011). A conservação da coleção é efetuada com base em sub-cultivo de rotina e foram também desenvolvidas metodologias de criopreservação para algumas microalgas (Osório *et al*, 2004; Amaral *et al*, 2009; Amaral *et al*, 2013).

Nos últimos anos o potencial biotecnológico de microalgas ACOI tem sido revelado por estudos do grupo, incidindo sobre a determinação da composição lipídica (Assunção *et al*, 2015), polissacarídeos (Ferreira *et al*, 2016), atividade antioxidante (Assunção *et al*, 2014) e, mais recentemente na produção de extratos para análise de atividade antibiótica e

antibiofilme (Amaral *et al*, 2016). Na sequência destes estudos, surge o interesse por uma nova abordagem de cultivo, utilizando culturas mistas de microalgas de forma a aumentar a produção de biomassa e respetivos compostos de interesse. Sendo esta uma ideia pouco explorada, torna-se necessário realizar estudos fundamentais para adquirir conhecimentos de base, que possam auxiliar no avanço desta área.

O presente estudo teve como objetivo principal estabelecer uma cultura mista composta por duas microalgas ACOI, verificar o seu desenvolvimento e a produção de lípido. Para isso foram selecionadas as espécies *Vischeria helvetica* ACOI 299 e *Asterococcus korschikoffii* ACOI 326, pertencentes a duas classes distintas, Eustigmatophyceae e Chlorophyceae, respetivamente. Cada estirpe foi inicialmente caracterizada em cultivo unialgal, quanto ao crescimento e conteúdo lipídico em diferentes fases do crescimento. Os mesmos parâmetros foram avaliados para as culturas mistas, recorrendo a duas estratégias distintas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material de estudo

Foram selecionadas duas estirpes da Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) (www.acoi.ci.uc.pt), *Vischeria helvetica* ACOI 299 e *Asterococcus korschikoffii* ACOI 326, colhidas por Jorge Paiva na Lagoa do Marinho, Serra do Gerês, no ano de 1987 e identificadas por Maria de Fátima Santos em 1988.

2.2 Estabelecimento e crescimento de culturas

O crescimento das culturas efetuou-se em condições autotróficas, numa sala climatizada, com a temperatura mantida a 23 °C com ar condicionado e com uma intensidade luminosa média de cerca de 56 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ e fotoperíodo de 16h:8h de luz:escuro. As culturas foram colocadas em balões de vidro Erlenmeyer de 250 ml e de 3 L e sujeitos a borbulhamento de ar.

O meio de cultura usado, denominado M7 (adaptado de Schlösser,1994) é constituído por nitrato de potássio (KNO_3) a 1%, sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) a 0,1%, fosfato de amónia dibásico [$(NH_4)_2HPO_4$)] a 0,2%, sulfato de cálcio ($CaSO_4$) em solução saturada (10 ml/L), extrato de solo (20 ml/L), extrato de *Sphagnum* (10 ml/L), micronutrientes (5 ml/L), vitamina B12 (1 ml/L) e água destilada (http://acoi.ci.uc.pt/).

O extrato de solo prepara-se com terra de jardim com pouco teor de húmus, adubos ou químicos. Pesam-se 200 g de terra para 1 L de água destilada, ferve-se durante uma hora e de seguida filtra-se com recurso a um filtro de papel e algodão hidrófilo. O material filtrado é centrifugado e autoclavado durante 1 hora a 120°C e 1 bar de pressão em três dias consecutivos. O extrato de *Sphagnum* é obtido a partir de 250 g de *Sphagnum* para 7,5 L de água destilada. É deixado de molho durante a noite e posteriormente fervido durante uma hora. Depois de arrefecer é filtrado com um filtro de papel e algodão hidrófilo. O material filtrado é autoclavado durante 1 hora a 120°C e 1 bar de pressão em três dias seguidos.

A solução de micronutrientes do meio M7 é composta por ácido bórico (H_3BO_3) (5ml/L), sulfato de manganês ($MnSO_4.1H_2O$) (2ml/L), sulfato de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$) (1 ml/L), sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) (1 ml/L) e molibdato de amónia [$(NH4)_6\ Mo_7O_{24}.4H_2O$] (5 ml/L).

O meio de cultura, depois de preparado foi sempre esterilizado num autoclave (Uniclave 88), durante 20 minutos, a uma temperatura de 120°C e pressão de 1 bar. O pH do

meio foi sempre controlado entre valores de 6,4 e 6,6, de maneira a evitar uma grande variação, o que poderia levar a alterações nas culturas.

Antes de qualquer análise e de forma a garantir um inóculo controlado, foi sempre preparada uma cultura mãe com 5 dias, através da diluição de uma cultura densa com M7 numa proporção de 1:1 (v/v), nas condições padrão referidas anteriormente, mas sem borbulhamento de ar. Além disso, todas as culturas foram sempre observadas ao microscópio ótico para garantir o bom estado fisiológico das células.

2.2.1 Monoculturas

As curvas de crescimento das microalgas foram obtidas através da monitorização da cultura ao longo de 27 dias, com base no peso seco da biomassa e na sua densidade celular. Foram iniciadas, simultaneamente, culturas equivalentes em balões Erlenmeyer de 250 ml, pela diluição da cultura-mãe em M7 numa proporção de 1:1 (v/v), com 120 ml de cultura e 120 ml de meio. Foram preparadas 24 culturas para a determinação da curva de crescimento com 8 pontos de avaliação, nos dias 0, 3, 6, 9, 13, 17, 22, 27. Todos os balões foram cultivados nas condições definidas e com borbulhamento de ar (Figura 9).

Figura 9: Cultivo de *Vischeria helvetica* para estudo da respetiva curva de crescimento.

Em cada ponto (P), por exemplo, após 3 dias de cultivo, foram retiradas 3 culturas-réplica (R) (P3 R1; P3 R2; P3 R3) e o peso seco foi avaliado. Para cada uma destas culturas-réplica (por exemplo P3 R1), foram retiradas 3 amostras de 10 ml de cultura para determinação do peso seco (P3 R1.1,P3 R1.2, P3 R1.3) (Figura 10). Cada amostra foi filtrada,

utilizando um sistema de filtração com discos de papel de filtro Whatman GF/C 47mm, previamente pesados, seguindo-se a lavagem com 10 ml de água destilada. De seguida, procedeu-se à secagem da mesma a 60 °C numa estufa e estabilização num exsicador. O peso seco de cada amostra, expresso em mg/ml, foi obtido pela subtração do peso inicial do filtro ao peso final do filtro com a amostra, calculando-se depois as respetivas médias e desvios-padrão. A curva de crescimento foi obtida através da representação gráfica do peso seco (y) em relação ao dia de avaliação (x).

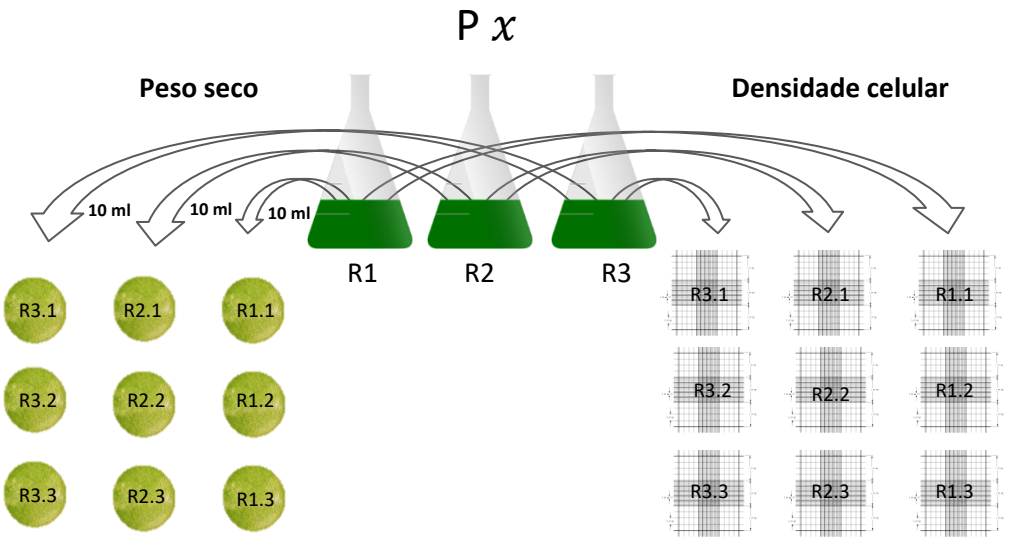


Figura 10: Esquema exemplificativo do protocolo experimental utilizado para determinar o crescimento individual das duas espécies de microalgas. Para cada dia (ponto da curva P x), foram amostradas 3 x 10 ml de cada cultura-réplica para a determinação do peso seco. No caso da densidade celular, foram feitas 3 contagens em hemocitómetro para cada cultura-réplica.

Da mesma forma, a densidade celular foi avaliada por contagem do número de células, efetuada em 3 alíquotas de cada cultura-réplica, ao microscópio ótico e com recurso a um hemocitómetro Neubauer (Figura 10). Calcularam-se as médias e os desvios-padrão e utilizou-se a fórmula fornecida pelo fabricante para estimar a densidade da cultura (células/ml).

2.2.2 Culturas mistas

As culturas mistas foram realizadas de acordo com duas estratégias. Na primeira, as duas espécies foram adicionadas com a mesma densidade celular (estratégia 1:1) e na segunda adicionou-se *Vischeria helvetica* com uma densidade celular quatro vezes superior à de *Asterococcus korschikoffii* (estratégia 4:1).

A determinação das curvas de crescimento foi realizada ao longo de 22 dias e com base na contagem do número de células (células/ml). Foram iniciadas culturas simultâneas em balões Erlenmeyer de 250 ml, pela diluição da cultura-mãe em M7 numa proporção de 1:1 (v/v). Foram preparadas 21 culturas para a determinação da curva de crescimento com 7 pontos de avaliação, nos dias 0, 3, 6, 9, 15, 17, 22. Todos os balões foram cultivados nas condições padrão e com borbulhamento de ar.

Para a estratégia 1:1, determinou-se a densidade celular das culturas-mãe e diluiu-se até se obter uma cultura de cada com, aproximadamente, 28 000 cél/ml. Seguidamente adicionou-se a cada balão de 250 ml, 120 ml de meio M7 e 60 ml de cada cultura de microalga, ficando a cultura mista com uma densidade celular de 14 000 células/ml para cada espécie, num total final de 28 000 cél/ml.

Na estratégia 4:1, diluiu-se a cultura-mãe de *V. helvetica* até se obter uma densidade de 45 000 cél/ml e a cultura-mãe de *A. korschikoffii* até 11 000 cél/ml. Do mesmo modo, foram adicionados a cada balão de 250 ml, 120 ml de meio M7 e 60 ml de cada tipo de microalga, perfazendo uma densidade celular final da cultura mista de 28 000 cél/ml.

Para a determinação da densidade celular em cada um dos sete dias pré-determinados, foram feitas 3 contagens para cada réplica, ao microscópio invertido e com recurso a uma câmara de contagem Sedgewick-Rafter. Foram efetuadas contagens para o número total de células da cultura mista, bem como contagens individuais para cada uma das espécies de modo a seguir a contribuição individual de cada uma na cultura mista. Calcularam-se as médias e os desvios-padrão para cada uma das réplicas e a curva de crescimento foi obtida através da representação gráfica da densidade celular (células/ml) em relação ao dia de avaliação.

Depois de obtidas as curvas de crescimento das monoculturas e das culturas mistas calculou-se a produtividade da fase exponencial de cada uma das culturas, tendo em conta a fórmula aplicada por Hempel *et al* (2012):

$$P_{biomassa}\ (g\ L^{-1}\ d^{-1}) = \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$$

em que, $P_{biomassa}$ é a produtividade de biomassa, X_1 e X_2 são os pesos secos da biomassa nos dias t_1 (início da fase exponencial) e t_2 (fim da fase exponencial). Também se calculou a produção de biomassa para cada uma das estirpes em cada uma das fases de crescimento. A produção, em g/L, é obtida através da subtração do peso seco da biomassa do último dia da fase pelo primeiro dia.

2.2.3 Culturas para a extração de lípidos

O cultivo da biomassa para a extração de lípidos foi realizado em balões Erlenmeyer de 3L com borbulhamento de ar e nas condições padrão anteriormente mencionadas. Com base nas curvas de crescimento de cada microalga foram determinados os dias em que estas se encontravam em fase exponencial, dias 6 e 9, e no início da fase estacionária, 15 e 17 para *Asterococcus korschikoffii* e *Vischeria helvetica*, respetivamente. Foram feitos os inóculos (Figura 11) e nestes dias, a biomassa foi centrifugada a 4500 rpm durante 5 minutos, congelada e posteriormente liofilizada.

Figura 11: Cultivo de biomassa para extração de lípidos.

2.3 Extração de lípidos

Foram testados três métodos de extração: i) extração convencional com Soxhlet, ii) extração com MTBE, descrita por Matyash *et al* (2008) e iii) extração de acordo com o método de Gao *et al* (2015) usado para *Vischeria stellata*. Estes métodos foram aplicados em duas fases do crescimento das microalgas, a fase exponencial e a fase estacionária, e em triplicado (Figura 12).

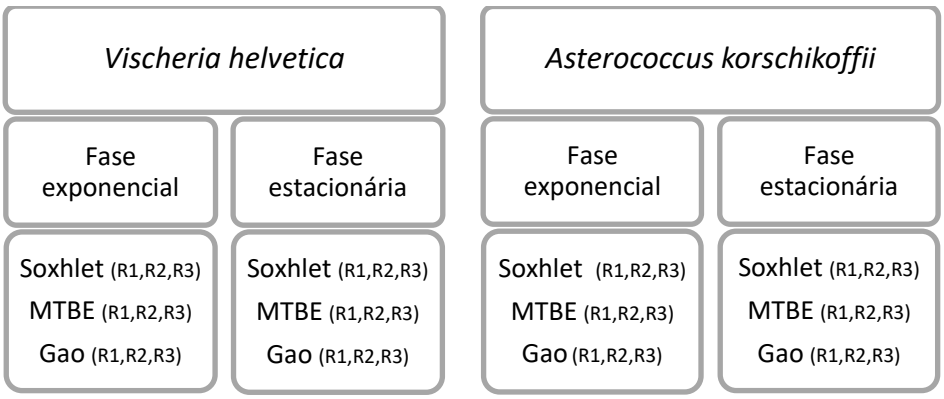


Figura 12: Esquema ilustrativo dos três métodos utilizados para extração de lípidos em *V. helvetica* e *A. korschikoffii.*

A produtividade lipídica de cada uma das microalgas foi calculada, para cada método e em cada um dos dias determinados, tendo em conta a fórmula aplicada por Gao *et al* (2015):

$$P_x\ (g\ L^{-1}d^{-1}) = \frac{DW\ (g\ L^{-1})\ \times\ C_x\ (\%\ DW)}{t\ (d)}$$

em que, P_x é a produtividade lipídica; DW é o peso seco; C_x é o conteúdo de lípido total e t é o tempo de cultura.

2.3.1 Extração com Soxhlet

O solvente utilizado neste método foi o hexano, um solvente apolar, considerado eficaz, devido à sua alta capacidade de extração e baixo custo (Harun *et al*, 2009). Este é colocado no balão de destilação do aparelho, numa quantidade equivalente a mais de metade da capacidade do balão correspondente a 80 ml.

Inicialmente colocaram-se 150 mg de cultura liofilizada num envelope feito com papel de filtro Whatman 42 Ashless 18.5 cm e este colocado na câmara de extração do Soxhlet, durante 18h (Mubarak *et al*, 2015) (Figura 13). No fim da extração, o solvente foi evaporado num evaporador rotativo BUCHI R-300, a amostra ressuspensa em clorofórmio, de forma a possibilitar a transferência para eppendorf, concentrada e seca num liofilizador FreeZone 4,5L. A amostra foi depois pesada e o lípido total determinado (mg de lípido/mg biomassa).

Figura 13: Extração do lípido total de *Vischeria helvetica* com Soxhlet, aos 17 dias de crescimento da cultura.

2.3.2 Extração com MTBE

Este método foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido por Matyash *et al* (2008), com algumas adaptações, em que o principal solvente utilizado é o éter metil *t*-butílico (MTBE). Para a primeira extração, num tubo Falcon com 150 mg de cultura liofilizada, adicionaram-se 6 ml de metanol e procedeu-se à homogeneização em vórtex durante,

aproximadamente 5 segundos. Em seguida adicionaram-se 20 ml de MTBE e a mistura permaneceu em agitação durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo, adicionaram-se 5 ml de água ultra pura e deixou-se incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente centrifugou-se a 1000 xg durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante, que contém a fração de lípido total. Numa segunda extração, adicionou-se ao pellet a solução composta por MTBE:metanol:água 10:3:2,5 (v/v/v), seguido de homogeneização em vórtex, centrifugação a 1000 xg durante 10 minutos e recolha do sobrenadante. Por fim, juntaram-se os sobrenadantes que continham o extrato lipídico e evaporou-se num evaporador rotativo, ressuspendeu-se em clorofórmio, concentrou-se e secou-se num liofilizador. A amostra foi depois pesada e o lípido total determinado (mg lípido/mg biomassa).

2.3.3 Extração segundo Gao *et al* (2015)

Este método foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido por Gao *et al* (2015) para *Vischeria stellata*, onde são utilizados vários solventes de extração. Inicialmente adicionaram-se a 150 mg de cultura liofilizada, 5 ml de uma solução DMSO-metanol (0,5ml-4,5ml respetivamente) e colocou-se a amostra em banho-maria a 50˚C durante 10 minutos, seguido de 30 minutos a 4˚C. Esta mistura foi depois centrifugada a 1000 xg durante 5 minutos e recolhido o sobrenadante. Adicionou-se ao pellet uma solução de 10 ml de éter:hexano 1:1 (v/v), colocou-se novamente a 4˚C durante 1 hora, centrifugou-se a 1000 xg durante 5 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Este passo foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes combinados. Por fim, adicionaram-se aos sobrenadantes 10 ml de água destilada e observou-se uma separação de fases, sendo que a fase superior corresponde à fração lipídica que foi posteriormente evaporada, ressuspendida em clorofórmio para transferir para eppendorf, concentrada e seca em liofilizador.

2.4 Separação das frações lipídicas

A separação das frações lipídicas foi realizada de acordo com a técnica descrita por Christie (1982) para separar os três grandes grupos de lípidos presentes nas microalgas: lípidos neutros, glicolípidos e fosfolípidos. Foi preparada uma coluna de cromatografia com 1 g de sílica gel em 5 ml de clorofórmio, onde se adicionou ao topo da coluna, o extrato de lípido

total diluído no mínimo volume de clorofórmio possível. A separação iniciou-se com a adição de 10 ml de clorofórmio de forma a eluir os lípidos neutros (Figura 14a), seguida de 10 ml de acetona para eluição dos glicolípidos (Figura 14b) e 10 ml de metanol para a eluição da fração fosfolipídica (Figura 14c). Cada fração foi recolhida (Figura 14d) e seca num evaporador rotativo. Ressuspendeu-se cada uma das frações em 1 ml de clorofórmio, concentrou-se, secou-se num liofilizador e, por fim, determinou-se o peso seco de cada fração (mg fração/mg lípido total).

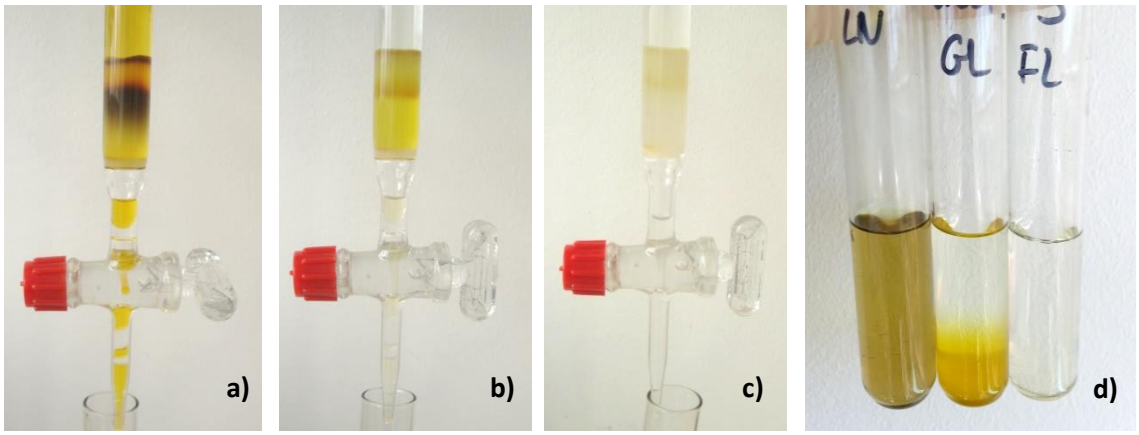


Figura 14: Separação das frações lipídicas. a) Separação dos lípidos neutros; b) separação dos glicolípidos; c) separação dos fosfolípidos; d) obtenção das três frações.

3. Resultados

altamente purificados, livres de resíduos de solventes e o tempo de extração e separação é relativamente rápido (Mercer & Armenta, 2011). A extração supercrítica envolve o uso de substâncias que possuem propriedades de líquidos e gases (por exemplo, CO_2) quando expostos a temperaturas e pressões críticas. Esta particularidade permite que funcionem como solvente de extração, sem deixar resíduos quando o sistema volta à pressão atmosférica e à temperatura ambiente (Harun *et al*, 2010). O dióxido de carbono é muito usado devido à sua baixa temperatura crítica (31,1 °C) e pressão (72,9 atm). Além disso, trata-se de um gás à temperatura ambiente que é facilmente removido no fim da extração, não é tóxico, não é inflamável, é pouco dispendioso e pode ser seguramente reciclado, o que o torna um solvente ambientalmente benéfico (Mercer & Armenta, 2011).

A nível industrial, o processo de extração de óleo a partir de microalgas é realizado, geralmente com disrupção celular mecânica, seguida de extração química com solventes (Ferrentino & Farag, 2006). A eficiência de um método de extração de lípidos, muitas vezes está associada à espécie de microalga usada e as diferenças observadas podem ser explicadas pelo tamanho da alga e composição da sua parede celular (Li *et al*, 2014).

Segundo Kumar *et al* (2015), o método mais recente e rigoroso para a extração de todas as classes de lípidos é o desenvolvido por Matyash *et al* (2008), que é uma modificação dos métodos de Folch/Bligh and Dyer. O solvente utilizado é o éter metil *t*-butílico (MTBE) e, segundo o mesmo autor, este método fornece os perfis lipídicos mais precisos, além de ser aplicável a todos os tipos de células que contenham lípidos, nas quais se incluem as microalgas.

A análise dos perfis de lípido total, bem como a existência de diferentes ácidos gordos em diferentes classes lipídicas de microalgas tem-se revelado uma área emergente e que se espera venha a identificar novos ácidos gordos com uma variedade de novos grupos funcionais (Lang *et al*, 2011).

1.3 Cultivo de microalgas para exploração de compostos

As microalgas que são usadas há seculos por populações indígenas na alimentação, incluem espécies como *Nostoc, Arthrospira* (*Spirulina*) e *Aphanizomenon* (Spolaore *et al*, 2006). Por exemplo, o lago Chade, em África ou o lago Texcoco, no México constituíam uma fonte de *Spirulina* para as pessoas que viviam nessas áreas. No entanto as primeiras tentativas de

Relativamente à curva de crescimento de *A. korschikoffii*, com base no peso seco da cultura (Figura 17), apresentou um aumento progressivo do peso seco desde o início até ao dia 13, a partir do qual se manteve relativamente estável até ao dia 22, entrando depois em declínio. O crescimento iniciou-se com 0,074 mg/ml e atingiu o seu máximo aos 13 dias com 0,63 mg/ml.

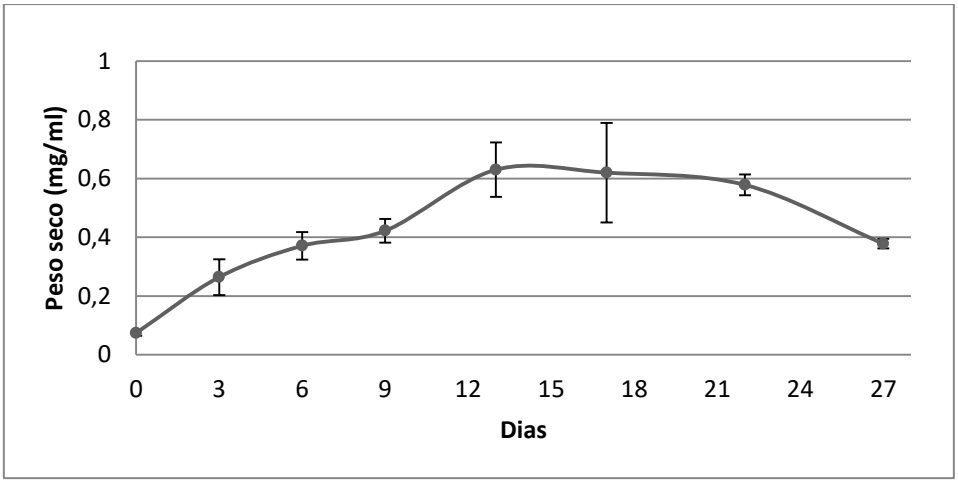


Figura 17: Curva de crescimento da monocultura de *Asterococcus korschikoffii* baseada no peso seco da biomassa.

No caso da curva de crescimento obtida com os valores de densidade celular (Figura 18), iniciou-se com 1,85 x 10^4 células/ml e observou-se um aumento do número de células, novamente até ao dia 13, onde se atingiu o pico máximo de 1,3 x 10^5 células/ml e a partir do qual se observou uma diminuição para valores de 7,9 x 10^4 células/ml, estabilizando nos últimos dias de cultura.

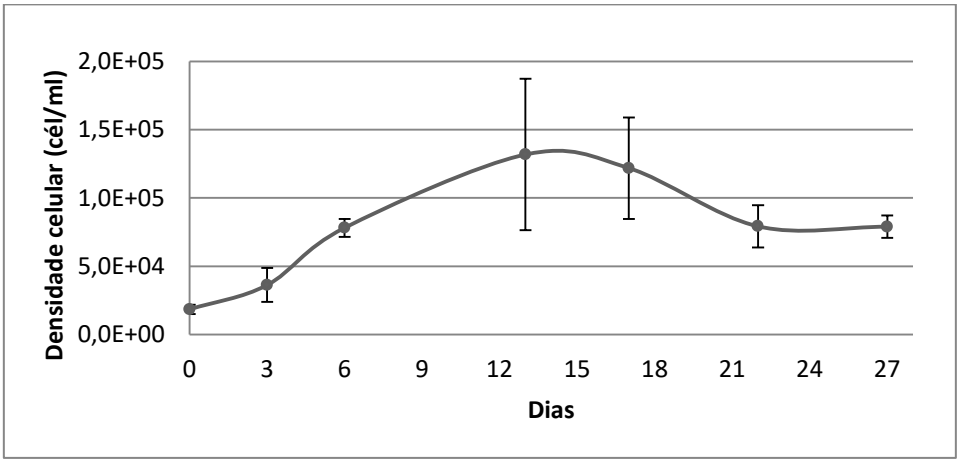


Figura 18: Curva de crescimento de *Asterococcus korschikoffii* com base na contagem de células.

3.1.2 Culturas mistas

Na estratégia 1:1 (Figura 19), o crescimento iniciou-se com 1,46 x 10^4 células/ml e ocorreu um ligeiro aumento do número de células até ao terceiro dia. Entre o dia 3 e o dia 9 observou-se um aumento significativo do número de células de 3,83 x 10^4 para 2,12 x 10^5 células/ml. Do dia 9 ao dia 17, aumentou ligeiramente e foi no dia 17 que se atingiu o número máximo de 2,42 x 10^5 células/ml. A partir deste dia, até ao fim da cultura, ocorreu uma diminuição da densidade celular para 1,63 x 10^5 células/ml.

Relativamente à contribuição individual de cada uma das espécies na estratégia 1:1, observou-se que, contrariamente ao de *V. helvetica*, o crescimento de *A. korschikoffii* acompanhou a curva da cultura mista (Figura 19). Este iniciou o seu crescimento com 4,29 x 10^3 células/ml, enquanto o número inicial de células de *V. helvetica* foi de 1,03 x 10^4 células/ml. No caso de *A. korschikoffii* ocorreu um aumento acentuado do número de células desde o terceiro dia, atingindo o máximo aos 17 dias, com 2,31 x 10^5 células/ml. Relativamente a *V. helvetica*, apesar do aumento do número de células não ter sido tão notório como em *A. korschikoffii*, observou-se um ligeiro aumento até aos 9 dias, onde se atingiu o pico máximo de 5,14 x 10^4 células/ml, seguido de uma diminuição progressiva do número de células até aos 22 dias, onde a sua densidade celular final é de 2,67 x 10^3 células/ml. Por outro lado, *A. korschikoffii* terminou a sua curva de crescimento com uma densidade celular de 1,60 x 10^5 células/ml.

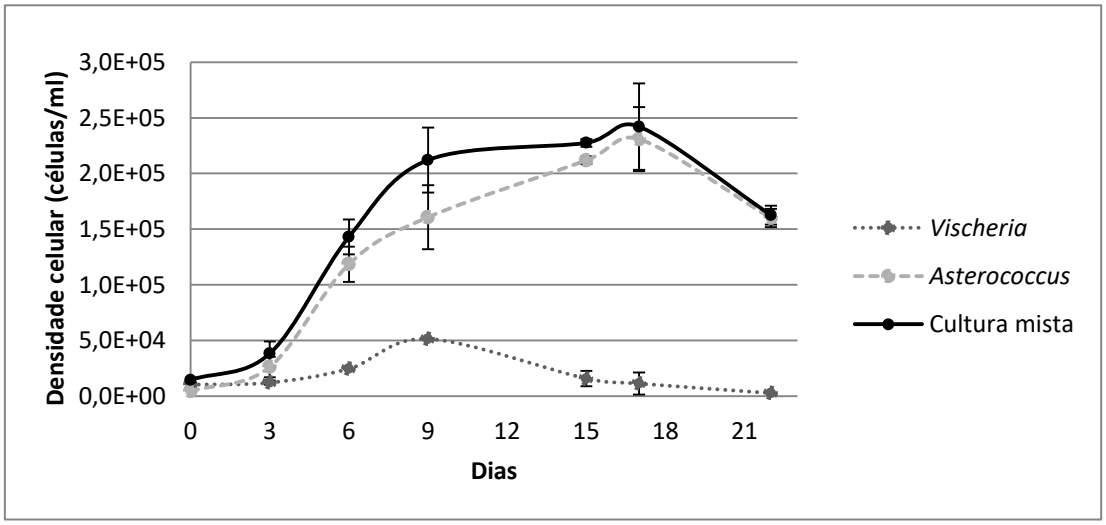


Figura 19: Curva de crescimento da cultura mista com a estratégia 1:1 baseada na contagem do número de células (linha completa) e contribuição individual das duas espécies (linhas ponteadas).

No caso da estratégia 4:1 (Figura 20), o crescimento iniciou-se com 1,55 x 10^4 células/ml e observou-se um aumento gradual até ao nono dia. Entre o dia 9 e o dia 15 ocorreu uma certa estabilização (também observada na estratégia 1:1), seguida de novo aumento até ao dia 17, onde a cultura atingiu o número máximo de células com 1,63 x 10^5 células/ml. A partir do dia 17 o número de células diminuiu até ao último dia de cultura, em que a sua densidade final foi de 1,47 x 10^5 células/ml.

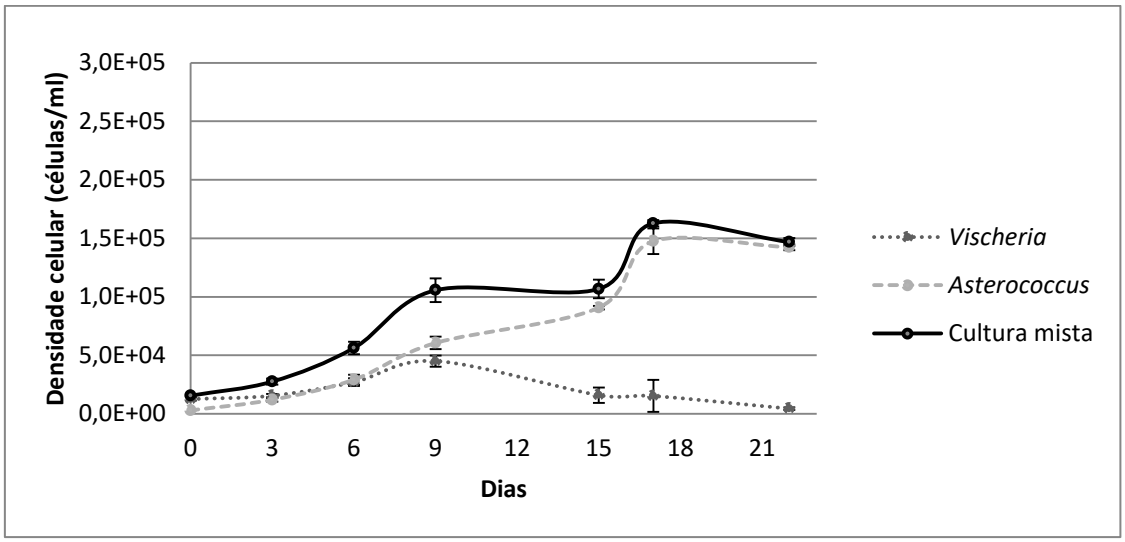


Figura 20: Curva de crescimento da cultura mista com a estratégia 4:1 com base na contagem do número de células (linha completa) e contribuição individual das duas espécies (linhas ponteadas).

No que diz respeito ao contributo individual de cada estirpe na estratégia 4:1, o crescimento de *A. korschikoffii* iniciou-se com 2,96 x 10^3 células/ml e o de *V. helvetica* com 1,26 x 10^4 células/ml (Figura 20). Em ambas as espécies, o número de células aumentou até ao nono dia, onde *V. helvetica* atingiu o seu máximo de 4,51 x 10^4 células/ml. A partir do dia 9, observou-se uma diminuição de *V. helvetica* até aos 22 dias, onde atinge a sua densidade final de 4,42 x 10^3 células/ml. Por outro lado, *A. korschikoffii* continuou a aumentar até ao dia 17, onde atingiu o máximo de 1,48 x 10^5 células/ml e a partir do qual começou a diminuir até aos 22 dias.

Ambas as culturas mistas foram iniciadas com uma densidade celular relativamente próxima, sendo que a estratégia 1:1 iniciou-se com 1,46 x 10^4 células/ml e a estratégia 4:1 com 1,55 x 10^4 células/ml (Figura 21). As curvas apresentam uma configuração semelhante, aumentando a sua densidade até aos 9 dias, seguido de estabilização dos 9 aos 15 dias, um novo aumento dos 15 aos 17 dias, embora mais acentuado na estratégia 4:1 e por fim uma

diminuição da densidade mais acentuada na estratégia 1:1. O número de células com que se finalizam as culturas mistas também é próximo, sendo de 1,63 x 10^5 células/ml para a estratégia 1:1 e de 1,47 x 10^5 células/ml para a estratégia 4:1.

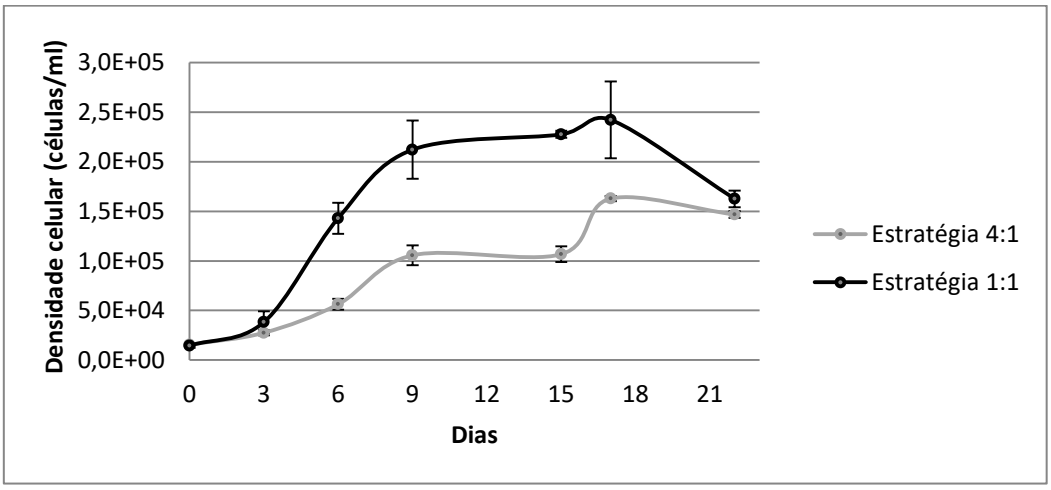


Figura 21: Comparação das curvas de crescimento das duas culturas mistas.

Comparando a contribuição individual de cada microalga em monocultura e em cultura mista, é possível perceber em qual dos casos é que esta apresentou um crescimento maior. No caso de *V. helvetica* (Figura 22), observou-se que esta atingiu uma maior densidade celular em monocultura, onde aumentou 7 vezes a sua densidade e atingiu o máximo do seu crescimento aos 27 dias com 1,01 x 10^6 células/ml. Em ambas as culturas mistas, esta microalga atingiu o seu máximo aos 9 dias, sendo que na estratégia 1:1 aumentou a sua densidade em 5 vezes enquanto na estratégia 4:1 aumentou em 4 vezes.

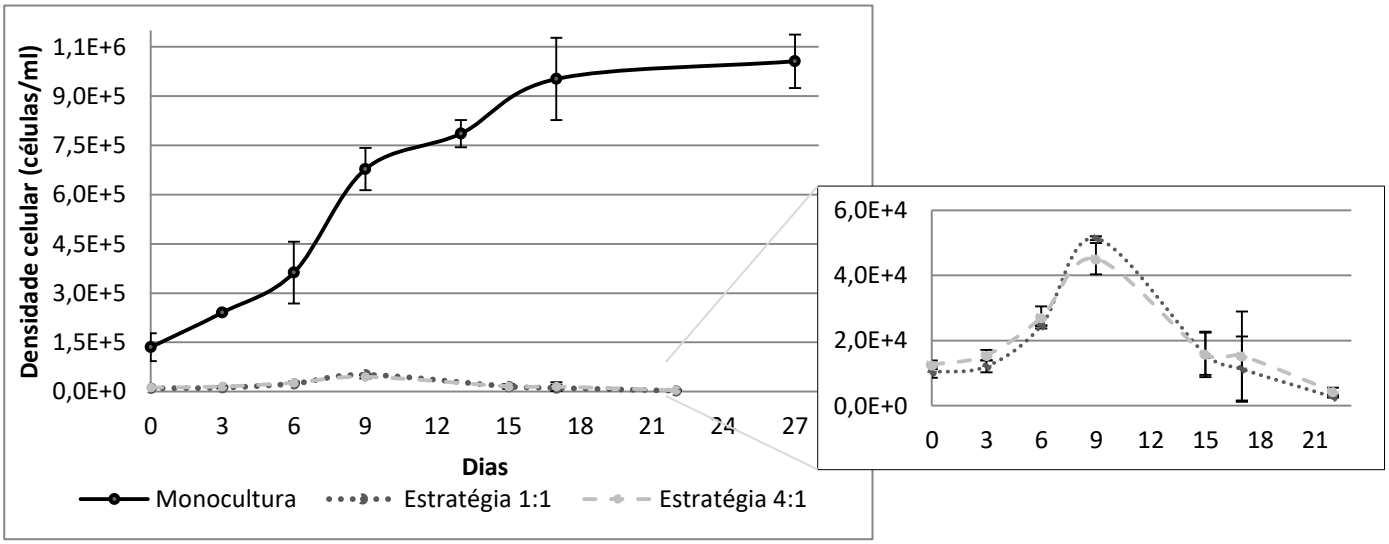


Figura 22: Crescimento de *V. helvetica* em monocultura (linha completa) e nas culturas mistas (linhas a tracejado), evidenciadas na caixa à direita.

Porém, no caso de *A. korschikoffii* (Figura 23), observou-se que este atingiu uma maior densidade em cultura mista, particularmente na estratégia 1:1, onde o ponto máximo de crescimento foi atingido aos 17 dias com 2,31 x 10^5 células/ml, aumentando em 54 vezes a sua densidade celular. Embora o número de células máximo atingido por esta microalga na estratégia 4:1 seja menor, 1,48 x 10^5 células/ml, o seu crescimento máximo foi também elevado, aumentando em 50 vezes o seu número de células. Em monocultura atingiu o seu máximo aos 13 dias com 1,32 x 10^5 células/ml, ou seja, aumentou a sua densidade celular em 7 vezes.

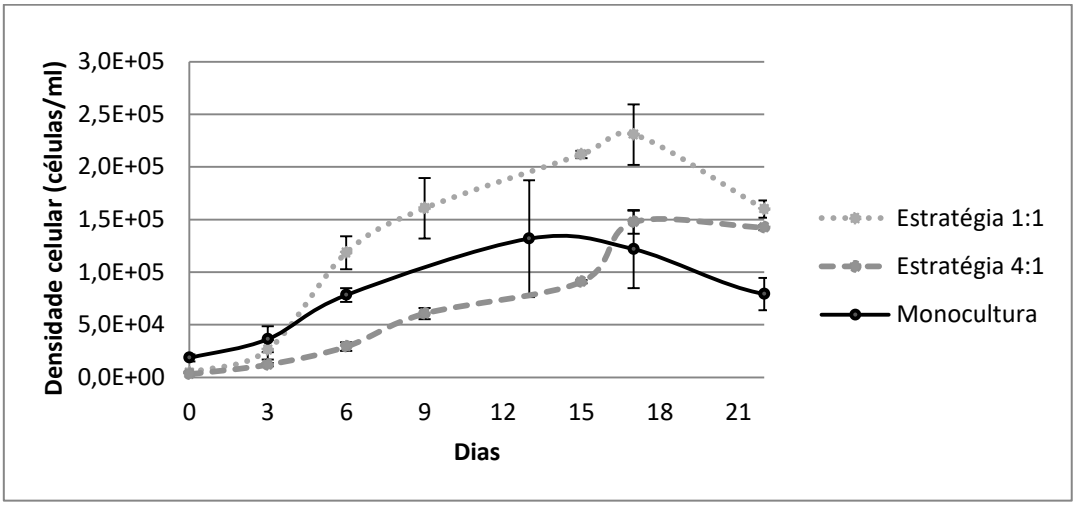


Figura 23: Crescimento de *A. korschikoffii* em monocultura (linha completa) e nas culturas mistas (linhas a tracejado).

Relativamente à produtividade de biomassa calculada para a fase exponencial de cada uma das culturas (monoculturas e culturas mistas) (Tabela 5), o valor mais alto deste estudo foi 0,11 $g.L^{-1}.d^{-1}$, registado para a microalga *V. helvetica*, sendo que o valor mais baixo foi de 0,016 $g.L^{-1}.d^{-1}$, que ocorreu na estratégia 4:1. Em termos de produção de biomassa, *V. helvetica* voltou a registar o valor mais elevado neste estudo, com 1,9 g/L ao fim de 17 dias de cultura. Entre as duas culturas mistas, a estratégia 1:1 foi a que registou um maior valor de produção de biomassa ao fim dos 17 dias com 0,841 g/L.

Tabela 5: Produtividade de biomassa na fase exponencial em $g.L^{-1}.d^{-1}$ e produção total de biomassa em g/L registadas para monoculturas e culturas mistas.

	Produtividade de biomassa fase exponencial ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	Produção de biomassa (g/L)	
V. helvetica	0,112	9 dias	0,850
		17 dias	1,900
A. korschikoffii	0,043	6 dias	0,296
		15 dias	0,576
Estratégia 1:1	0,041	6 dias	0,211
		9 dias	0,371
		15 dias	0,791
		17 dias	0,841
Estratégia 4:1	0,016	6 dias	0,051
		9 dias	0,141
		15 dias	0,291
		17 dias	0,351

3.2 Lípidos

3.2.1 Monoculturas

Para as monoculturas, a extração de lípidos foi realizada, em ambas as espécies, em dois pontos da curva de crescimento, um na fase exponencial e outro na fase estacionária. No caso da fase exponencial, os dias estabelecidos foram 6 e 9, e no caso da fase estacionária 15 e 17, para *A. korschikoffii* e *V. helvetica,* respetivamente.

Os valores de lípido total obtidos neste estudo, para as duas microalgas, são apresentados na Tabela 6. No caso de *V. helvetica* aos 9 dias, a maior quantidade de lípido total foi obtida pelo método de Gao com 176,22 miligramas de lípido por miligramas de biomassa seca (mg/g), seguindo-se o método de Soxhlet com 156,22 mg/g e por fim, o método de MTBE com o valor mais baixo, de 141,11 mg/g. Os valores obtidos aos 17 dias são todos superiores aos da fase exponencial e, novamente, o método através do qual se obteve maior valor de lípido total foi o método de Gao com 294 mg lípido/g biomassa, seguido de Soxhlet com 184,89 mg lípido/g biomassa e MTBE com 170,67 mg lípido/g biomassa.

Relativamente aos valores obtidos para *A. korschikoffii* aos 6 dias, o método que registou maior quantidade de lípido total foi o método de MTBE com 162,22 mg /g, seguido do método de Gao com 121,33 mg/g e por fim o método de Soxhlet com 34,00 mg/g. No caso da fase estacionária, os valores obtidos são todos inferiores aos da fase exponencial, contudo

observou-se, novamente, uma maior quantidade de lípido total no método de MTBE com 88,89 mg/g, seguido do método de Gao com 82,67 mg/g e o valor mais baixo, de 47,78 mg/g, para o método de Soxhlet.

Tabela 6: Valores de lípido total em miligrama de lípido por grama de biomassa obtidos nas duas fases de crescimento para *V. helvetica* e *A. korschikoffii*.

Método	Lípido total (mg/g)			
	V. helvetica		*A. korschikoffii*	
	Fase exponencial 9 dias	Fase estacionária 17 dias	Fase exponencial 6 dias	Fase estacionária 15 dias
Soxhlet	156,22 ± 2,69	184,89 ± 2,78	34,00 ± 10,37	47,78 ± 4,91
MTBE	141,11 ± 16,74	170,67 ± 12,45	162,22 ± 5,09	88,89 ± 11,74
Gao	176,22 ± 11,00	294,00 ± 27,38	121,33 ± 14,25	82,67 ± 6,96

Após a determinação dos valores de lípido total, calculou-se a produtividade lipídica com base na fórmula referida anteriormente (Tabela 7). Para tal é necessário calcular a conteúdo lipídico em percentagem de peso seco. É possível inferir que os valores do conteúdo lipídico bem como da produtividade refletem os valores de lípido total, tendo em conta que os métodos onde se obteve maior quantidade de lípido total correspondem aos que têm uma produtividade lipídica maior. Além disso, as produtividades máximas encontradas para as duas microalgas são valores relativamente próximos. Para o caso de *V. helvetica*, o valor de produtividade lipídica mais alto é de 0,92 $g.L^{-1}.d^{-1}$, no método de Gao aos 17 dias e a produtividade mais baixa ocorreu no método de MTBE aos 9 dias com 0,43 $g.L^{-1}.d^{-1}$. Por outro lado, em *A. korschikoffii*, o valor de produtividade mais elevado foi atingido aos 6 dias, no método de MTBE, com 1,00 $g.L^{-1}.d^{-1}$ enquanto o valor mais baixo se registou no método de Soxhlet com 0,21 $g.L^{-1}.d^{-1}$.

Tabela 7: Conteúdo lipídico em percentagem de peso seco e produtividade lipídica em gramas por litro por dia, obtida para cada um dos métodos em *V. helvetica* e *A. korschikoffii*.

Espécie	Método	Fase	Conteúdo lipídico (% peso seco)	Produtividade lipídica ($g.L^{-1}.d^{-1}$)
V. helvetica	Soxhlet	Exponencial (9 d)	15,62	0,47
		Estacionária (17 d)	18,49	0,58
	MTBE	Exponencial (9 d)	14,11	0,43
		Estacionária (17 d)	17,07	0,53
	Gao	Exponencial (9 d)	17,62	0,53
		Estacionária (17 d)	29,40	0,92
A. korschikoffii	Soxhlet	Exponencial (6 d)	3,40	0,21
		Estacionária (15 d)	4,78	0,21
	MTBE	Exponencial (6 d)	16,22	1,00
		Estacionária (15 d)	8,89	0,39
	Gao	Exponencial (6 d)	12,13	0,75
		Estacionária (15 d)	8,27	0,36

Como mencionado anteriormente, o lípido total foi sujeito a fracionamento de modo a separar as três grandes classes de lípidos presentes nas microalgas: lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) e fosfolípidos (FL). As percentagens de cada fração lipídica são apresentadas na figura 24 para *V. helvetica* e na figura 25 para *A. korschikoffii*.

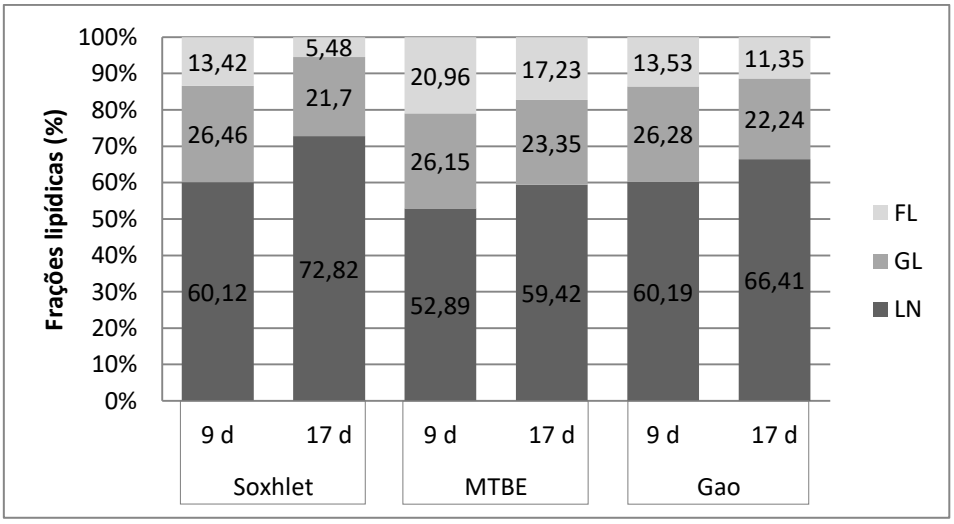


Figura 24: Frações lipídicas obtidas após fracionamento do lípido total de *V. helvetica*. FL – fosfolípidos; GL – glicolípidos; LN – lípidos neutros.

No caso de *V. helvetica* (Figura 24), é possível observar que há uma tendência, em que a fração que constitui a maior parte do lípido total são os lípidos neutros, que assumem em todos os métodos mais de 50% do lípido total, seguido dos glicolípidos e por fim os fosfolípidos. Relativamente à determinação efetuada pelo método de Soxhlet, a percentagem de lípidos neutros nas células aumentou da fase exponencial (60,12%) para a fase estacionária (72, 82%), enquanto as percentagens de glicolípidos e de fosfolípidos diminuíram de 26,46% para 21,7% e de 13,42% para 5,48% nas mesmas fases. Este padrão também se verificou no caso das determinações efetuadas pelos métodos de MTBE e de Gao. Pelo método de MTBE, observou-se um aumento dos lípidos neutros de 52,89% para 59,42%, enquanto os glicolípidos diminuíram de 26,15% para 23,35% e os fosfolípidos de 20,96% para 17,23%. No método de Gao os lípidos neutros aumentaram de 60,19% para 66,41%, os glicolípidos diminuíram de 26,28% para 22,24% e os fosfolípidos de 13,53% para 11,35% (Figura 24).

Relativamente a *A. korschikoffii* (Figura 25), as determinações efetuadas pelos 3 métodos em ambas as fases não demonstraram uma tendência semelhante, como ocorreu para *V. helvetica.* Embora a maior fração seja constituída por lípidos neutros, exceto no caso do Soxhlet a 15 dias, os glicolípidos também apresentam uma percentagem considerável. Tal como anteriormente, os fosfolípidos também se revelaram a fração mais pequena do conteúdo lipídico total.

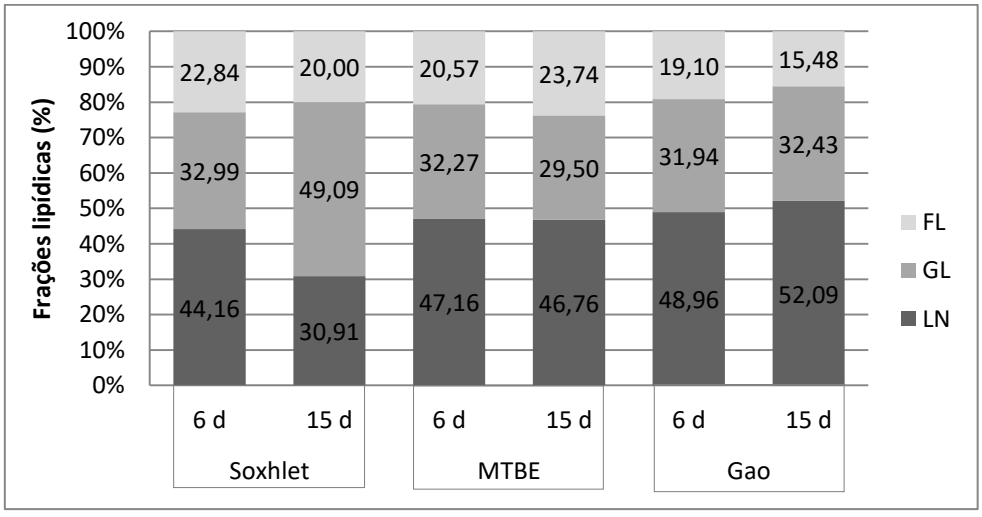


Figura 25: Frações lipídicas obtidas após fracionamento do lípido total de *A. korschikoffii;* FL – fosfolípidos; GL – glicolípidos; LN – lípidos neutros.

No caso da determinação efetuada pelo método de Soxhlet, observou-se uma diminuição da percentagem de lípidos neutros da fase exponencial (44,16%) para a fase estacionária (30,91%), contrariamente à percentagem de glicolípidos que aumentou de 32,99% para 49,09%. Os fosfolípidos também diminuíram de 22,84% para 20%. No método de MTBE não se observa grande variação da percentagem de lípidos neutros, já que os valores são relativamente próximos, 47,16% na fase exponencial e 46,76% na fase estacionária. No caso dos glicolípidos registou-se uma diminuição dos seus valores da fase exponencial (32,27%) para a fase estacionária (29,50%) e um aumento dos fosfolípidos de 20,57% para 23,74%. No método de Gao, a percentagem de lípidos neutros aumentou de 48,96% para 52,09%, tal como a de glicolípidos de 31,94% para 32,43%, enquanto os fosfolípidos diminuíram de 19,10% para 15,48%.

3.2.2 Culturas mistas

No que diz respeito à extração de lípidos das culturas mistas, o método utilizado foi o método de Gao, escolhido com base nos resultados das extrações das monoculturas. O lípido total foi determinado para os mesmos dias em que se determinou o conteúdo lipídico das monoculturas (Tabela 8). Em ambas as culturas mistas os valores de lípido total mais elevados foram registados ao fim de 6 dias de cultura, observando-se depois uma diminuição destes ao longo do tempo. O valor de lípido total mais elevado foi observado aos 6 dias da estratégia 4:1, enquanto o valor mais baixo foi registado na estratégia 1:1, aos 15 dias de crescimento.

Tabela 8: Conteúdo lipídico total em miligrama de lípido por grama de biomassa seca (mg/g) das duas culturas mistas.

	Lípido total (mg/g)	
Dias	**Estratégia 1:1**	**Estratégia 4:1**
6 dias	70,97	182,86
9 dias	51,32	106,67
15 dias	20,82	87,5
17 dias	23,67	66,45

4. Discussão

4.1 Critérios de seleção das microalgas

Este estudo teve como objetivo principal estabelecer uma cultura mista e, a primeira microalga selecionada para a sua realização foi *Vischeria helvetica*, pertencente à Classe Eustigmatophyceae. O interesse por espécies desta classe é de longa data no nosso laboratório (Santos & Leedale, 1991; Santos, 1996; Amaral *et al*, 2011; Amaral *et al*, 2015), tendo dado origem ao isolamento e estabelecimento de cerca de cem estirpes ACOI. O interesse tem também vindo a aumentar a nível global já que estes organismos apresentam um grande potencial para a produção de ácidos gordos tendo em vista o uso como suplementos nutricionais ou para biocombustíveis (Fawley *et al*, 2014). Além disso, a estirpe ACOI 299 já tinha previamente revelado uma boa atividade antioxidante (Assunção *et al*, 2014). Desta forma, o estudo do seu crescimento e da componente lipídica torna-se um contributo essencial para a caracterização desta microalga.

A seleção da segunda microalga foi feita de acordo com o local de colheita da mesma, ou seja, espécies que coexistiam no ambiente natural em conjunto, possivelmente também poderiam coexistir num sistema artificial. Na mesma colheita de *Vischeria helvetica* ACOI 299, encontravam-se presentes e foram isoladas em cultura mais 8 microalgas, nomeadamente, *Chlorobotrys regularis* ACOI 307, *Elakatothrix linearis* ACOI 309, *Myrmecia bisecta* ACOI 322, *Asterococcus korschikoffii* ACOI 326, *Euglena elongata* ACOI 337, *Euglena agilis* ACOI 835 e *Monoraphidium griffithii* ACOI 863 (http://acoi.ci.uc.pt). Considerando que *C. regularis* é uma eustigmatofícea tal como *V. helvetica*, que *E. linearis*, *E. elongata* e *E. agilis* são microalgas que crescem relativamente pouco em condições laboratoriais, as opções de escolha ficaram restritas a *M. bisecta*, *A. korschikoffii e M. griffithii*, três clorófitas. Destas espécies de microalgas, apenas a descrição de *A. korschikoffii* relatava na sua morfologia a presença de uma camada gelatinosa (Bourrelly, 1990), característica que pode potenciar o seu interesse biotecnológico. Desta forma, tendo em conta que o cultivo misto tem interesse do ponto de vista de exploração de compostos, esta microalga aparentou ser uma boa escolha.

Assim sendo, as microalgas escolhidas para a realização da cultura mista foram *V. helvetica*, uma eustigmatofícea e *A. korschikoffii*, uma clorófita. No início do estudo os principais aspetos que se conheciam acerca deste conjunto, resultantes do cultivo de rotina da Algoteca era que utilizavam o mesmo meio de cultura e que cresciam relativamente bem em condições laboratoriais. Além disso, o facto de serem microalgas com uma morfologia bem diferente facilitaria a sua distinção, permitindo a estimativa da dinâmica da população na cultura mista pela contagem de células.

4.2 Crescimento das culturas

4.2.1 Monoculturas

Através da análise das curvas de crescimento de *Vischeria helvetica* e *Asterococcus korschikoffii* é possível identificar, de acordo com Lee *et al* (2015), as principais fases de uma curva sigmoide que caracteriza o crescimento de microalgas em cultivo *batch*: fase de latência, fase exponencial, fase linear do crescimento, fase de decréscimo de crescimento, fase estacionária e fase de decadência. Durante a fase inicial de latência, há um crescimento mínimo, devido à presença de células não viáveis ou a adaptações fisiológicas ao meio de cultura. No entanto, esta fase pode ter um curto período de duração, se a cultura-mãe for cultivada no mesmo meio de cultura e com as mesmas condições, fazendo com que a adaptação das células ao novo meio seja mais rápida (Andersen, 2005; Lee *et al*, 2015). A fase exponencial é caracterizada pelo rápido crescimento em que as células se dividem como uma função exponencial de tempo, que abrandam na fase linear, na qual a divisão celular ocorre a uma taxa constante até os nutrientes se tornarem limitantes. A fase de decréscimo de crescimento é caracterizada pela diminuição da taxa de divisão e quando esta taxa se aproxima de zero, é atingida a fase estacionária. A fase de decadência é devida à depleção de nutrientes, perturbações de pH ou contaminações (Lee *et al*, 2015). Classicamente apenas são consideradas quatro fases principais na curva sigmoide típica: fase de latência, fase exponencial, estacionária e de declínio (Andersen, 2005; Barsanti & Gualtieri, 2006). Neste caso, a fase exponencial considerada engloba três das fases descritas por Lee *et al* (2015), a fase exponencial, a fase linear de crescimento e a fase de decréscimo de crescimento.

As curvas de crescimento de *V. helvetica* revelam uma configuração idêntica nos dois métodos utilizados. Segundo o peso seco da biomassa, a fase de latência manifesta-se durante 3 dias, seguindo-se a fase exponencial que também dura 3 dias, a fase linear de crescimento com 7 dias, a fase de decréscimo de crescimento com 4 dias e por fim a fase estacionária com 10 dias. Relativamente à curva de crescimento baseada na densidade celular, esta é caracterizada pela fase exponencial dos 0 aos 3 dias, seguindo-se a fase linear do crescimento do dia 3 ao dia 9, a fase de decréscimo de crescimento do dia 9 ao dia 17 e por fim a fase estacionária do dia 17 ao dia 27.

No caso de *A. korschikoffii* os métodos utilizados na monitorização do crescimento revelaram curvas com uma configuração relativamente diferente, particularmente nos últimos dias de cultura. A análise da curva de crescimento baseada no peso seco da biomassa permite identificar a fase exponencial com duração de 3 dias, seguindo-se a fase linear de crescimento com 10 dias, a fase de decréscimo de crescimento com 4 dias, a fase estacionária com 5 dias e

uma fase de decadência com 5 dias. A curva de crescimento baseada na densidade celular inicia-se do mesmo modo, com uma fase exponencial de 3 dias, seguindo a fase linear de crescimento com 10 dias, uma fase de decadência com 9 dias e por fim a fase estacionária com 5 dias. Esta tendência invertida, em que se observa uma fase de declínio antes da fase estacionária pode ser explicada pelo método de contagem utilizado, que originou subestimação dos valores. As células foram contadas com um hemocitómetro no entanto, para além das células de *A. korschikoffii* serem grandes, também se observou que, a partir dos 9 dias, a cultura apresentava uma maior viscosidade o que dificultava a introdução da amostra na câmara de contagem do hemocitómetro, pelo que é possível que a partir desse dia, a estimativa da densidade celular possa apresentar um erro associado a este problema. Neste caso, de ambas as metodologias utilizadas, a mais adequada para caraterizar o crescimento de *A. korschikoffii* será, provavelmente através do peso seco. Assim sendo, na caracterização das culturas mistas, a câmara de contagem utilizada foi a de Sedgewick-Rafter que permite a introdução de 1 ml de cultura e que é muito utilizada na contagem de fitoplâncton filamentoso e de zooplâncton.

As curvas de crescimento com base no peso seco das microalgas revelam um aumento de peso de 16 vezes em *V. helvetica* que atingiu um peso final de 2,15 mg/ml ao fim de 27 dias de cultivo, enquanto *A. korschikoffii* aumentou 5 vezes e não chegou a atingir 1 mg/ml. No caso de *V. helvetica,* após atingir a fase estacionária, o seu peso seco manteve-se estável, contrariamente ao de *A. korschikoffii*, em que ocorreu um declínio do peso a partir do dia 22. Este declínio poderá ser explicado pelo esgotamento de nutrientes e pela acumulação de compostos que possam, de alguma forma, possam interferir com as células em cultura (Lee *et al*, 2015).

Nas curvas de crescimento baseadas na contagem de células em hemocitómetro, se considerarmos a fase exponencial como Andersen (2005), ou seja englobando a fase exponencial, fase linear de crescimento e fase de decréscimo de crescimento de Lee *et al* (2015), *V. helvetica* apresentou uma fase exponencial mais longa, com 17 dias, enquanto *A. korschikoffii* apresentou uma fase exponencial mais curta, com duração de 10 dias. Esta fase é caracterizada pela divisão e multiplicação celular, que leva até o pico máximo de crescimento e, neste caso, observou-se que *A. korschikoffii* apresenta um crescimento mais rápido do que *V. helvetica*, já que a sua fase exponencial é mais curta, atingindo o seu máximo em menos tempo do que *V. helvetica,* apesar de esta crescer mais. Nesta curva de crescimento, *V. helvetica* aumentou a sua densidade celular em 7 vezes, enquanto *A. korschikoffii* apenas aumentou 4 vezes o seu número de células, ao fim de 27 dias de cultivo.

As diferenças que possam existir entre os dois tipos de curvas de crescimento, peso seco e densidade celular, são consequência dos métodos utilizados serem diferentes. Contudo, a curva baseada na densidade celular poderá ser o método que permite uma estimativa mais realista do estado da cultura, tendo em conta que só se contam as células viáveis. No caso do método por peso seco, todo o conteúdo da cultura é contabilizado, fazendo com que os detritos celulares, células inviáveis ou exopolissacarídeos possam contribuir para o aumento do peso. No entanto, e como já foi explicado anteriormente, no caso de *A. korschikoffii* o peso seco revelou-se o melhor método tendo em conta a particularidade da densidade celular.

Nas monoculturas a produtividade de biomassa na fase exponencial foi superior para *V. helvetica*, com 0,11 $g.L^{-1}.d^{-1}$. Este valor de produtividade encontra-se abaixo dos referenciados para algumas eustigmatofíceas, como *Monodus subterraneus*, 0,19 $g.L^{-1}.d^{-1}$ ou *Nannochloropsis* sp., 0,17-1,43 $g.L^{-1}.d^{-1}$ (Mata *et al*, 2010). No caso de *A. korschikoffii* o valor de 0,043 $g.L^{-1}.d^{-1}$ registado é concordante com os valores de produtividade de biomassa referidos na bibliografia para algumas clorófitas, como por exemplo *Chlorella vulgaris*, com 0,02-0,20 $g.L^{-1}.d^{-1}$ ou *Scenedesmus* sp. que apresenta valores de 0,03-0,26 $g.L^{-1}.d^{-1}$ (Mata et al., 2010). Em comparação com *Chlamydocapsa bacillus*, uma microalga da mesma família que *A. korschikoffii,* os valores referenciados para esta são superiores, 0,32 $g.L^{-1}.d^{-1}$ (Nascimento *et al*, 2013). Esta variação de valores pode ocorrer entre espécies, dentro da mesma espécie, sendo que também podem ocorrer diferenças na mesma estirpe, resultado de diferentes condições de cultivo utilizadas, nomeadamente luz ou temperatura (Griffiths & Harrison, 2009).

4.2.2 Culturas mistas

Para o estabelecimento das culturas mistas, como não se tinha conhecimento do comportamento das duas espécies em conjunto, em condições controladas e à escala laboratorial, a primeira estratégia testada foi a estratégia 1:1, em que as duas espécies foram adicionadas com a mesma densidade celular. O crescimento desta cultura mista caracterizou-se por uma fase exponencial de 3 dias, uma fase linear de crescimento com 3 dias, fase de decréscimo de crescimento com 3 dias, fase estacionária com 6 dias e por fim uma fase de declínio com duração de 5 dias. Relativamente ao comportamento das espécies nesta cultura mista, a curva de crescimento de *A. korschikoffii* apresentou uma fase exponencial com 3 dias, seguido da fase linear com 12 dias, a fase de decréscimo de crescimento com 2 dias e por fim, uma fase de decadência com 5 dias. A sua curva de crescimento individual tem uma conformação semelhante à da cultura mista o que é indicativo de que esta alga foi a que mais

contribuiu para esta. No caso de *V. helvetica*, a sua curva iniciou-se com uma fase exponencial de 3 dias, seguido de fase linear com 6 dias, sendo que a partir do dia 9 é bem visível a diminuição desta espécie, que se manteve em decadência até ao fim da cultura. Este acontecimento pode ser explicado pela grande quantidade de *A. korschikoffii* presente na cultura, três vezes mais do que *V. helvetica*, o que faz com que haja muito mais consumo de nutrientes por parte desta, ou pelo aumento da viscosidade do meio, consequência da libertação de mucilagem de *A. korschikoffii* para o meio de cultura, que pode também contribuir para o aprisionamento dos nutrientes disponíveis.

Esta cultura mista foi iniciada com um número de células total de 28 000 células/ml (14 000 de cada microalgas) no entanto, apesar de terem sido utilizados inóculos iniciais com densidades celulares controladas, as densidades iniciais registadas não corresponderam ao valor esperado. O que se verificou nas observações e contagens das culturas do ponto 0 foi que, após a junção das duas culturas, havia muitas células a entrar em colapso, tanto de *A. korschikoffii* como de *V. helvetica*. Uma possível explicação para este facto pode ter sido a utilização de uma cultura demasiado densa dos inóculos iniciais, que fez com que a diluição para se obter a densidade pretendida tenha sido num fator demasiado elevado, ou seja, que uma quantidade excessiva de meio de cultura tenha sido adicionada. Este efeito não foi tido em atenção nas monoculturas, no entanto a hipótese do mesmo acontecer não é descartada. Nenhuns dos estudos prévios (e.g. Johnson & Admassu, 2012; Mingazzini & Palumbo, 2015) mencionam situações semelhantes.

O número total de células desta cultura mista sofreu um aumento de 16 vezes até atingir o seu pico máximo no dia 17. No entanto, entre o dia 9 e o dia 15 observou-se uma diminuição da taxa de divisão caracterizada por uma estabilização do número de células em cultura (fase estacionária) que pode ser consequência de ao nono dia, as células de *V. helvetica* entrarem em declínio, contrariamente às de *A. korschikoffii* que continuaram a aumentar, compensando esse efeito. A curva de crescimento de *V. helvetica* nesta cultura mista é mais curta quando comparada com a monocultura, já que completa a sua fase exponencial em 9 dias, aumentando a sua densidade em 5 vezes ao passo que em monocultura, aos 9 dias ainda estaria a meio da fase exponencial, completando a sua fase exponencial no dia 17 e tinha um aumento de 7 vezes. Contrariamente, *A. korschikoffii* apresentou uma fase exponencial mais longa, de 17 dias, em que cresceu 53 vezes até atingir o seu pico máximo, quando comparado com a monocultura, onde cresceu no máximo 7 vezes. Este acontecimento pode ser explicado pelo uso de uma câmara de contagem diferente. Como

referido anteriormente, nas monoculturas, as células foram contadas num hemocitómetro, mas este método não se revelou eficaz para o caso de *A. korschikoffii*. Desta forma, para a elaboração das culturas mistas foi utilizada uma câmara de Sedgewick-Rafter que permite utilizar 1 ml de cultura para a contagem. Neste caso, ambas as espécies apresentam comportamentos diferentes em monocultura e em cultura mista, contrariamente ao observado por Novoveská *et al* (2016), em que o crescimento de *Dunaliella* sp. e de *Phaeodactylum tricornutum* é semelhante nos dois sistemas de cultivo (unialgal e misto).

A estratégia 1:1 não se revelou eficaz para o estabelecimento da cultura mista já que *A. korschikoffii* revelou um maior crescimento, quando comparado com *V. helvetica,* sendo que na fase exponencial, este apresenta uma densidade 4 vezes superior à de *V. helvetica*. Para além disso, após o nono dia *V. helvetica* começa a morrer ao passo que *A. korschikoffii* continua a aumentar o seu número de células, causando, possivelmente, um maior consumo de nutrientes. Um comportamento semelhante foi observado num estudo de Mingazzini & Palumbo (2015) com *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum*. Neste estudo, *D. tertiolecta* apresentou curvas de crescimento semelhantes, quer em monocultura quer em cultura mista, ao contrário de *P. tricornutum*, que em monocultura atingiu uma densidade celular muito superior à de *D. tertiolecta*, mas em cultura mista o seu crescimento foi interrompido ao fim de 6 dias, não sendo capaz de competir com *D. tertiolecta*, que continuou a aumentar a sua densidade celular até ao dia 13. A principal razão apontada para o sucesso de *D. tertiolecta* é a sua elevada eficiência na captação dos nutrientes disponíveis, o que permitiu a sua dominância no sistema (Mingazzini & Palumbo, 2015).

A partir desta análise, a estratégia que se pensou ser mais interessante testar foi a da estratégia 4:1, onde se adicionou *V. helvetica* com uma densidade celular 4 vezes superior à densidade de *A. korschikoffii*, de maneira a tentar compensar o efeito de um crescimento muito maior de *A. korschikoffii* do que de *V. helvetica,* e de facto, até ao nono dia, o crescimento das duas espécies manteve-se relativamente semelhante entre si, em contraste com a estratégia 1:1, onde *A. korschikoffii* começou a aumentar de forma elevada logo no terceiro dia. Novamente, apesar da diluição dos inóculos ter sido feita de maneira a ficar com uma densidade inicial da cultura mista de 28 000 células/ml, observou-se o mesmo efeito da estratégia 1:1, em que muitas células sofreram colapso. Contudo a proporção manteve-se e a estratégia 4:1 foi iniciada com 4 vezes mais *V. helvetica* do que *A. korschikoffii*.

Na estratégia 4:1 registou-se uma fase exponencial com duração de 3 dias, seguido da fase linear de crescimento de 3 dias, a fase de decréscimo de crescimento novamente com

3 dias, fase estacionária de 6 dias, novamente fase exponencial com 2 dias e por fim uma fase de decadência até ao fim da cultura mista. Nesta estratégia houve um incremento do número total de células em 10x. Relativamente a cada uma das espécies, *V. helvetica* volta a ter o mesmo comportamento que na estratégia 1:1, com uma fase exponencial inicial de 3 dias, seguido de uma fase linear de crescimento de 6 dias e uma fase de decadência até ao final da cultura. No caso de *A. korschikoffii*, registou-se uma fase exponencial com 3 dias, seguido de uma fase linear de crescimento de 6 dias, fase de decréscimo de crescimento com 6 dias, novamente fase exponencial com 2 dias e por fim decadência até ao fim da cultura. Nesta cultura mista, é possível observar que a curva de *A. korschikoffii* só se assemelha à da cultura mista a partir do dia 15, sendo que o seu maior contributo só ocorreu a partir desse dia, contrariamente ao caso anterior, onde toda a curva da cultura mista era descrita em função da curva de *A. korschikoffii*. Nesta cultura mista *A. korschikoffii* aumentou o seu número de células, no máximo, em 50 vezes enquanto *V. helvetica*, novamente, aumentou no máximo 4 vezes.

À semelhança da estratégia 1:1, observou-se uma estabilização do crescimento do dia 9 ao dia 15, o que refletiu, novamente, a diminuição de *V. helvetica* e o aumento de *A. korschikoffii,* embora neste caso tenham sido mais atenuados. A quantidade de *A. korschikoffii* já não foi tão superior à de *V. helvetica*, o que pode indicar que o aumento da viscosidade do meio, mais do que a diferença da quantidade de células, influencia *V. helvetica* levando à diminuição da sua presença em cultura. A partir do dia 15, e até ao dia 17, observou-se um novo aumento da densidade celular da cultura mista consequência do aumento de *A. korschikoffii*, já que *V. helvetica* continuou a diminuir ao longo do tempo. Este aumento pode dever-se ao facto de a competição por nutrientes ser menor ou talvez, de *V. helvetica*, à medida que morre, libertar alguma substância permita dar oportunidade a *A. korschikoffii* para aumentar a sua densidade celular.

De uma forma geral, a configuração das curvas de crescimento das duas culturas mistas é semelhante, tendo aumentado de uma forma gradual até ao nono dia, onde atingiram um patamar de estabilização até ao dia 15, aumentaram entre o dia 15 e o dia 17 e depois diminuíram a sua densidade até ao fim da cultura. No entanto na estratégia 1:1 registou-se uma maior densidade celular logo a partir do dia 3, sendo que no dia 9 se registou o dobro do número de células da estratégia 4:1. Ambas as culturas mistas não apresentaram fase de latência, situação também verificada por Novoveská *et al* (2016) em cultura mista de *Dunaliella* sp. e *Phaeodactylum tricornutum*.

Relativamente ao comportamento de *V. helvetica* em monocultura e cultura mista, esta espécie cresceu melhor em monocultura, onde aumentou a sua densidade em 7 vezes. Nas culturas mistas, o seu melhor desempenho, tal como no caso de *A. korschikoffii*, ocorreu na estratégia 1:1, onde aumentou 5 vezes enquanto na estratégia 4:1 aumentou 4 vezes. Em ambas as culturas mistas, esta espécie apresentou uma curva de crescimento muito mais curta, em que o seu máximo foi atingido aos 9 dias, enquanto em monocultura esta situação apenas se verificou ao fim de 17 dias. Este acontecimento pode ser explicado pela libertação de mucilagem de *A. korschikoffii*. Ao fim dos 9 dias, muitas das células de *A. korschikoffii* já não estavam associadas em colónias, ou seja, tinham-se separado e como consequência, a mucilagem começou a dispersar-se pelo meio, aumentando gradualmente a sua viscosidade e possivelmente, aumentando a captura da componente hídrica do meio de cultura, que poderá ficar hipertónico, afetando principalmente as células de *V. helvetica* que não têm "proteção" como as de *A. korschikoffii*, que está envolvido em mucilagem. Esta suposição é apoiada por um teste adicional de precipitação de exopolissacarídeos que foi realizado, em que se determinou a quantidade de exopolissacarídeos presentes no meio de cultura a 6 e a 15 dias. Desta forma, pressupõe-se que *V. helvetica* seja altamente influenciada pela mucilagem libertada por *A. korschikoffii.* Outro motivo poderia ser o facto de *A. korschikoffii* se encontrar em grande quantidade no sistema, no entanto a realização da estratégia 4:1, em que a quantidade de *A. korschikoffii* até aos 9 dias foi semelhante à de *V. helvetica*, tornou a hipótese da libertação de mucilagem mais plausível.

No caso de *A. korschikoffii*, o seu aumento ocorreu nas duas culturas mistas de uma forma semelhante, sendo que na estratégia 1:1 aumentou a sua densidade em 54 vezes enquanto na estratégia 4:1 aumentou 50 vezes, no entanto como o número de células com que se iniciou a cultura foi inferior, como consequência, o seu máximo também foi menor. Em monocultura, a sua densidade aumenta no máximo 7 vezes, no entanto, o facto de as câmaras de contagem terem sido diferentes pode ter influenciado os resultados. Esta microalga, nas condições definidas, em cultura mista atingiu o seu máximo ao fim dos 17 dias enquanto em monocultura isto ocorreu 4 dias antes, ou seja aos 13 dias. Isto poderá ser explicado pela quantidade de *V. helvetica* no sistema, isto é, até ao dia 9, *V. helvetica* ainda se encontrava numa quantidade considerável e *A. korschikoffii* não se terá conseguido desenvolver no seu máximo mas, à medida que aquela foi desaparecendo no sistema, deu oportunidade para *A. korschikoffii* se desenvolver e atingir o seu máximo um pouco mais tarde, o que poderá indicar que o seu crescimento poderá ser influenciado pela presença de *V. helvetica*. Este efeito foi observado nas duas culturas mistas, tendo sido mais notório na estratégia 4:1 onde a

densidade celular de *V. helvetica* foi maior. Outro aspeto do comportamento de *A. korschikoffii* que se observou nas culturas mistas foi o aumento do número de células no dia 15, que não se verificou na sua monocultura. Neste dia, o número de células de *V. helvetica* já era muito inferior, ou seja, muitas das células já tinham colapsado e, consequentemente o seu conteúdo celular espalhado para o meio de cultura o que, eventualmente, poderá disponibilizar alguma substância que, de alguma maneira, tenha sido aproveitada por *A. korschikoffii*, contribuindo para o seu aumento.

A cultura mista em que a estratégia utilizada foi a diluição de 1:1 revelou ser mais eficaz em termos de produção de biomassa do que a estratégia 4:1, tendo em conta que a sua densidade celular foi superior e consequentemente, a produtividade de biomassa na fase exponencial (0,041 $g.L^{-1}.d^{-1}$) e a produção de biomassa (0,841 g/L) também foram superiores.

Em comparação com as monoculturas, as culturas mistas apresentam valores inferiores, sendo que a monocultura de *V. helvetica* apresentou os valores mais elevados quer de produtividade de biomassa na fase exponencial (0,11 $g.L^{-1}.d^{-1}$) quer na produção de biomassa (1,9 g/L). Por outro lado, a produtividade de biomassa na fase exponencial de *A. korschikoffii* (0,043 $g.L^{-1}.d^{-1}$) e da estratégia 1:1 (0,041 $g.L^{-1}.d^{-1}$) são muito semelhantes, no entanto esta produtividade no caso da cultura mista é atingida ao fim de 9 dias, ao passo que na monocultura é atingida ao fim de 13 dias. Em termos de produção de biomassa, aos 15 dias a estratégia 1:1 apresenta um valor superior (0,791 g/L) à da monocultura de *A. korschikoffii* (0,576 g/L). Johnson & Admassu (2012) relataram que a co-cultura de espécies menos produtivas com outras que apresentem médias de produtividade de biomassa mais elevadas pode resultar em culturas mais densas, que podem atingir produtividades de biomassa próximas das espécies mais produtivas. O cultivo de *A. korschikoffii* com *V. helvetica* está em concordância com esta premissa, já que resultou em maior produção de biomassa e num valor de produtividade semelhante contudo, atingido mais cedo. Num estudo de Gonçalves *et al* (2016), dentro das culturas estudadas, as co-culturas de *Chlorella vulgaris* e *Microcystis aeruginosa* com *Synechocystis salina* aumentaram as produtividades de biomassa, o que, segundo estes autores, pode estar relacionado com relações simbióticas entre estes microrganismos.

cultivo em tanques abertos são atribuídas aos alemães durante a segunda guerra mundial. Nessa altura, as algas foram cultivadas principalmente como suplementos alimentares. Nos anos 70, a produção comercial de algas foi iniciada na Europa de Leste, Israel e Japão, sendo as algas cultivadas em tanques abertos para uso como alimento saudável. De facto, o propósito do cultivo de algas tem ido de encontro às necessidades específicas das populações. Por exemplo, nos Estados Unidos, os sistemas de cultivo a céu aberto foram desenvolvidos para o tratamento de águas residuais (Ugwu *et al*, 2008).

Com o passar do tempo, a biomassa algal tornou-se muito importante no campo da aquacultura e recentemente tem recebido muita atenção pois os seus produtos metabólicos podem ter diversas aplicações em indústrias, como a alimentar, cosmética ou farmacêutica (Borowitzka, 1999; Ugwu *et al*, 2008). Podem ser usadas como alimento para outros organismos, marinhos e terrestres, suplementos alimentares ou ainda serem usadas para processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização de solos, biocombustíveis e fitorremediação de resíduos tóxicos (Perez-Garcia *et al*, 2011). Deste modo, há um mercado em expansão que enfrenta um novo desafio de cultivar algas em larga escala, sem prejudicar o ambiente (Cardozo *et al*, 2007).

A exploração comercial em larga escala começou no Japão com o cultivo de *Chlorella*, sendo que em 1980 já existiam 46 unidades de fabrico em larga escala na Ásia, produzindo mais de 1000 kg desta microalga por mês (Spolaore *et al*, 2006). Atualmente, considerando todos os produtos derivados de microalgas, a produção das espécies *Spirulina* e *Chlorella* é a maior, apenar de concentrada apenas em algumas empresas, maioritariamente da Ásia e EUA. O volume de produção global estimado de *Spirulina* e *Chlorella* é de 5000 e 2000 toneladas de matéria seca por ano, respetivamente, e os valores de produção rondam os 40 milhões de dólares cada ano (Vigani *et al*, 2015).

São várias as aplicações das microalgas desde a nutrição humana e animal aos cosméticos e à produção de compostos de grande valor como pigmentos, ácidos gordos, etc. (Tabela 3). As principais espécies com interesse comercial cultivadas são *Chlorella* e *Spirulina* para alimentação humana, *Dunaliella salina* como fonte de β-caroteno, *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina e várias outras espécies em aquacultura (Borowitzka, 1999).

Entre as duas microalgas, *V. helvetica* apresentou um conteúdo de lípido total superior, que aumentou da fase exponencial para a fase estacionária como acontece na maioria das microalgas (Huerlimann *et al*, 2010; D'Alessandro *et al*, 2016). A quantidade de lípido total na fase exponencial é, normalmente, inferior à da fase estacionária tendo em conta que, durante a fase exponencial o principal foco é o crescimento e proliferação já que os nutrientes ainda estão disponíveis no meio e as condições ainda se mantêm favoráveis. À medida que as condições da cultura se alteram (depleção de nutrientes, limitação de luz, alterações de pH) o número de células atinge o seu máximo e inicia-se a fase estacionária, onde o aumento do lípido total se deve principalmente ao aumento dos níveis de lípidos neutros, constituídos por TAGs. O aumento dos TAGs na fase estacionária indica que a alga se encontra a armazenar lípidos para uma utilização subsequente como fonte de energia ou para a síntese de lípidos membranares em condições de limitação de nutrientes (Miller *et al*, 2012; Nalder *et al*, 2015). A situação contrária ocorre em *A. korschikoffii*, em que se observou um valor de lípido total superior na fase exponencial, que diminuiu na fase estacionária. Esta diminuição poderá estar associada ao aumento da produção de exopolissacarídeos, isto porque, no método de MTBE, aos 6 dias, o valor de lípido total de *A. korschikoffii* foi de 162,22 mg/g e a quantidade de exopolissacarídeos de 57,25 mg/L, enquanto aos 15 dias, se registou um valor de lípido total de 88,89 mg/g e de 329,35 mg/L de exopolissacarídeos. Esta relação inversamente proporcional também já foi observada em outras microalgas, como é o caso de *Porphyridium cruentum* em que, com o envelhecimento da cultura, o carbono fixado fotossinteticamente é desviado para a produção de exopolissacarídeos (Fábregas *et al*, 1998).

Em relação à percentagem do conteúdo lipídico, os melhores valores de *V. helvetica* (17,07% - 29,4%) estão de acordo com os valores referenciados para outras eustigmatofíceas como por exemplo *Monodus subterraneus* com 16% e *Nannochloropsis oculata* com 22,7% a 29,7% (Mata *et al*, 2010). No caso de *A. korschikoffii,* os valores de conteúdo lipídico (3,4% - 16,22%) também estão de acordo com os valores registados para algumas clorófitas, como no caso de *Chlorella vulgaris* com percentagens de 5,0 a 58,0%, ou *Tetraselmis* sp. com 12,6 a 14,7% (Mata *et al*, 2010). Em comparação com uma espécie da mesma família, *Chlamydocapsa bacillus,* os valores de conteúdo lipídico obtidos para *A. korschikoffii* encontram-se na mesma gama de valores obtidos por esta espécie (13,52%) (Nascimento *et al*, 2013). Em termos de produtividade lipídica, o valor mais alto registado para *V. helvetica* foi de 0,92 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para a fase estacionária, um valor superior ao referenciado num estudo realizado por Gao *et al* em 2015 para *V. stellata* cultivada em condições de nitratos variáveis em que a produtividade mais elevada obtida foi de 0,28 $g.L^{-1}.d^{-1}$. No entanto, em comparação com *A. korschikoffii*, estes

valores são inferiores já que o seu maior valor de produtividade lipídica foi de 1,00 $g.L^{-1}.d^{-1}$. Esta comparação entre espécies torna-se, por vezes difícil, já que o metabolismo e composição das várias espécies podem variar muito sob condições ambientais diferentes. Fatores como a temperatura, luz e disponibilidade de nutrientes podem influenciar a produtividade lipídica, refletindo diferentes resultados conforme as condições de cultivo, desenho experimental ou métodos de extração de lípido utilizados (Griffiths *et al*, 2012).

Em relação à separação das diferentes frações lipídicas em *V. helvetica*, a maior fração de lípido total corresponde aos lípidos neutros, que ocupa mais de 50% do total, seguindo-se os glicolípidos e os fosfolípidos. O método que extraiu mais quantidade de lípidos neutros, nesta microalga, foi o Soxhlet. Tendo em conta que, neste método, o solvente utilizado foi o hexano, um solvente apolar, seria de esperar que houvesse uma maior quantidade de lípidos neutros, já que se tratam de compostos apolares e por conseguinte, são extraídos por solventes apolares. Os lípidos neutros são, maioritariamente constituídos por triacilgliceróis que são a maior reserva de energia nos corpos lipídicos das células, contudo é também nesta fração que se encontram os carotenoides (Sajilata *et al*, 2008) e sendo que *V. helvetica* é uma microalga que acumula grandes quantidades de carotenoides (Aburai & Abe, 2015), é possível que parte da fração de lípidos neutros corresponda a estes pigmentos. Esta fração também foi a maior no caso do método de Gao, o que demonstra que este método também se revelou muito eficaz na extração dos lípidos neutros e, possivelmente, carotenoides.

As diferentes classes de lípidos presentes nas microalgas apresentam diferentes graus de polaridades, como referido anteriormente e a eficiência da extração pode depender do tipo de solvente utilizado. Por exemplo, para extrair lípidos neutros eficientemente é necessário utilizar um solvente apolar, como por exemplo o hexano. Já no caso dos fosfolípidos, a sua extração requer solventes polares como por exemplo o metanol. Contudo, por vezes torna-se necessário utilizar uma sequência ou uma mistura de solventes de forma a aumentar a eficiência da extração (Kannan & Pattarkine, 2014). No método de MTBE, apesar de ser o método no qual se obteve menor quantidade de lípidos neutros, a quantidade de glicolípidos e fosfolípidos registada foi maior do que nos outros métodos, o que permite inferir que este método fornece uma boa gama representativa da fração total dos lípidos nas microalgas, como já referido na bibliografia por Kumar *et al* (2015). Neste caso também se verificou o aumento da fração de lípidos neutros à medida que se atinge a fase estacionária e a diminuição das frações de glicolípidos e fosfolípidos. Em condições ótimas de crescimento, as microalgas

sintetizam lípidos membranares, fosfolípidos para as membranas dos vários organelos e glicolípidos para as membranas fotossintéticas (Gao *et al*, 2015).

Relativamente às frações lipídicas em *A. korschikoffii*, a maior fração continua a corresponder, na sua maioria, aos lípidos neutros, no entanto nesta microalga as percentagens desta fração são relativamente mais baixas do que as observadas, para a mesma fração, em *V. helvetica*. Neste caso é possível observar que as frações de glicolípidos e fosfolípidos têm uma percentagem maior do que as mesmas em *V. helvetica*. Tendo em conta que *A. korshikoffii* é uma microalga que produz mucilagem, esta quantidade superior de glicolípidos pode estar associada à produção de exopolissacarídeos (Elbein, 1979). Para esta microalga, os métodos de MTBE e Gao foram aqueles em que se registou maior quantidade de lípidos neutros, no entanto também foram eficientes em retirar a fração lipídica polar, ou seja, os glicolípidos e os fosfolípidos.

Num estudo de Olmstead *et al* (2013), foi feita a extração de lípidos e separação das frações lipídicas de duas microalgas, *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp., uma clorófita e uma eustigmatofícea. Embora os valores das frações neste estudo sejam expressos em mg/g, o cálculo da percentagem permite a comparação dos valores, sendo que as percentagens das frações de *V. helvetica* (LN – 66,41%, GL – 22,24%, FL – 11,35%) estão de acordo com as obtidas para *Nannochloropsis* sp. (LN – 68,15%, GL – 22,30%, FL – 9,55%). No caso de *A. korschikoffii* a percentagem da fração de lípidos neutros (47,16%) é inferior à obtida com *Chlorella* sp. (LN – 62,92%), a percentagem de glicolípidos é semelhante (*A. korschikoffii* 32,27%; *Chlorella* sp. 28,65%) e a percentagem de fosfolípidos (20,57%) é maior do que em *Chlorella* sp. (8,43%). Esta diferença de valores pode ser associada aos diferentes métodos de extração de lípidos utilizados já que, neste caso o método utilizado foi o de Bligh and Dyer, e isso poderá refletir valores diferentes, associados a eficácias diferentes (Li *et al*, 2014).

Como já foi referido anteriormente*, V. helvetica* apresentou valores de conteúdo lipídico dentro da gama ou próximos dos valores registados para algumas microalgas oleaginosas. Em comparação com a espécie *Botryococcus braunii,* que apresenta valores entre os 25 e 75% (Mata *et al*, 2010) e é considerada uma microalga com grande potencial para a produção de lípidos, *V. helvetica*, além de apresentar valores de conteúdo lipídico dentro desta gama de valores, apresenta uma produtividade de biomassa superior ao valor referenciado para *B. braunii*, de 0,02 $g.L^{-1}.d^{-1}$, o que aponta que esta microalga pode ser interessante do ponto de vista biotecnológico.

4.3.2 Culturas mistas

Para a análise do lípido total das culturas mistas, o método escolhido para esta determinação foi o método de Gao. Este método foi o melhor método para extração de lípido total na monocultura de *V. helvetica* e o segundo melhor em *A. korschikoffii*. Não se optou pelo método de MTBE, que foi o melhor para *A. korschikoffii*, porque este foi o pior dos três para *V. helvetica*, nem pelo de Soxhlet já que este foi muito pouco eficaz para *A. korschikoffii,* possivelmente por causa da polaridade da mucilagem que envolve as células, e assim não poderia ser o método escolhido para a extração de lípidos nas culturas mistas. Desta forma, o método de Gao pareceu ser o melhor método de extração, uma vez que utiliza uma mistura de solventes com diferentes polaridades que, como já mencionado, ajuda a melhorar a eficiência da extração. Além disso, foi com este método que se obteve a maior fração de lípidos neutros em *A. korschikoffii*, e segunda maior em *V. helvetica*. Como referido anteriormente, é na fração de lípidos neutros que se encontra o maior interesse biotecnológico, já que é a partir desta que se obtêm a maior parte dos triacilgliceróis (TAGs).

Em termos gerais, os valores de lípido total das duas culturas mistas seguem uma certa tendência, sendo que os valores iniciais são superiores e observa-se uma diminuição destes à medida que a cultura vai envelhecendo. O valor de lípido total aos 6 dias foi o mais elevado em ambas as culturas mistas, contudo a estratégia 4:1 apresentou um valor de lípido total quase 3 vezes superior ao da estratégia 1:1. Uma possível explicação para este acontecimento pode ser o facto de *A. korschikoffii* aos 6 dias, em monocultura, ter um maior rendimento lipídico. Além disso, nesta estratégia foi adicionada uma maior quantidade inicial de *V. helvetica*, que em monocultura se revelou uma boa produtora de lípidos. Contudo, aos 9 dias, altura em que *V. helvetica* atinge o seu máximo, em ambas as culturas mistas, ocorre uma diminuição do lípido total da cultura mista, quando seria de esperar um valor superior, já que mais células de *V. helvetica* contribuiriam com mais lípido, aumentando assim o seu valor aos 9 dias. Tendo em conta que a monitorização do crescimento da cultura mista não foi feita diariamente, pressupõe-se que *V. helvetica* poderá ter atingido um ponto máximo entre os 6 e os 9 dias, que não tenha sido detetado, fazendo com que no dia 9 já estivesse em declínio e consequentemente a quantidade de lípido fosse inferior. Como mencionado anteriormente, a maior quantidade de lípidos é encontrada, geralmente, na fase estacionária tendo em conta que, como já foi referido por outros autores, estes compostos podem ser mais tarde utilizados como fonte de energia ou para a síntese de lípidos membranares em condições de limitação

de nutrientes (Miller *et al*, 2012; Johnson & Admassu, 2012; Nalder *et al*, 2015). Neste caso, a libertação de mucilagem por parte de *A. korschikoffii* pode ter limitado a disponibilidade de nutrientes, fazendo com que *V. helvetica* tenha começado a consumir as suas reservas para poder sobreviver e, consequentemente, pouco contribuiu para o conteúdo lipídico da cultura mista, diminuindo assim o valor de lípido total aos 9 dias.

A diminuição do lípido total dos 9 para os 15 dias também pode ser consequência da diminuição de *V. helvetica*, sendo que na estratégia 4:1, a diminuição do lípido total não é tão brusca como na estratégia 1:1, em concordância com o que se verificou nas curvas de crescimento. Os valores de lípido total mais baixos foram observados ao fim de 17 dias de cultura mista, o que pode ser explicado pelo facto do sistema ser maioritariamente constituído por *A. korschikoffii* que, como já foi visto anteriormente, apresenta uma diminuição do lípido total com o envelhecer da cultura, já que o seu metabolismo é, provavelmente, desviado para a produção de exopolissacarídeos (Fábregas *et al*, 1998).

O valor de lípido total mais elevado, aos 6 dias, foi obtido na estratégia 4:1 e este valor é superior aos valores de lípido total obtidos nas monoculturas, quer aos 6 dias em *A. korschikoffii* quer aos 9 dias em *V. helvetica*, revelando que são necessários apenas 6 dias em cultura mista para se obter o mesmo que em 9 dias de monocultura. Desta forma, esta estratégia revelou que, pelo menos até aos 6 dias, esta cultura mista é mais produtiva em termos lipídicos, estando de acordo com alguns estudos que indicam que a produtividade lipídica aumenta em culturas mistas (Gonçalves *et al*, 2016). Pressupõe-se que esta característica só não se mantém porque o sistema é completamente alterado a partir do momento em que *A. korschikoffii* liberta a sua mucilagem para o meio de cultura. Este acontecimento, provavelmente tem uma influência negativa sobre *V. helvetica*, que diminui a sua densidade gradualmente até ao fim da cultura.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos num estudo de Johnson & Admassu em 2012 com quatro espécies de microalgas, *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp., *Chlorella* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, em que a produção lipídica das culturas mistas aumentou no início do cultivo à medida que a biomassa aumentava mas, com o envelhecimento da cultura, a produção lipídica diminuiu, o que segundo os mesmos autores foi consequência do facto da espécie com menor percentagem lipídica ter começado a dominar a cultura, enquanto as espécies com capacidade para uma maior produção de lípido representarem apenas uma pequena fração. Nestas culturas mistas, o máximo de conteúdo lipídico atingido foi de 8%, diminuindo para valores menores que 5%. Em comparação com a estratégia 4:1 da cultura mista de *A. korschikoffii* e *V. helvetica*, o conteúdo lipídico mais elevado foi de 18% diminuindo

depois para valores de 7%,o que indica que o conteúdo lipídico desta cultura mista foi superior ao registado por estes autores.

Segundo um estudo de Novoveská *et al* (2016), uma forma de prevenir a competição exclusiva numa cultura mista de duas espécies poderá passar pela manipulação das condições ambientais, conjugando espécies que produzam quantidades substanciais do mesmo ou de compostos diferentes, mas que tenham condições ótimas diferentes. No caso das culturas mistas de *A. korschikoffii* e *V. helvetica,* a alteração das condições de cultura, como por exemplo, nutrientes, pH e fornecimento de CO_2, poderia fazer com que *A. korschikoffii* não se tornasse dominante no sistema, dando possibilidade a *V. helvetica* para se desenvolver e permanecer em cultura, contribuindo para o aumento do lípido total do sistema.

5. Conclusões

Este estudo consistiu numa abordagem compreensiva do cultivo de duas estirpes de microalgas em simultâneo, com caracterização do seu comportamento em sistema unialgal e misto, e também do contributo individual de cada espécie para o cultivo misto.

O cultivo unialgal permitiu demonstrar que ambas as estirpes possuem um potencial biotecnológico interessante. *Vischeria helvetica* ACOI 299 desenvolveu quantidades significativas de biomassa ao fim de 17 dias de cultivo e apresentou um rendimento lipídico elevado, atingindo valores de 17,07% - 29,40%, equivalentes aos referidos para outras eustigmatofíceas. *Asterococcus korschikoffii* ACOI 326 apresentou um crescimento mais rápido, atingindo o seu máximo após 13 dias de cultivo contudo, com quantidades de biomassa inferiores. O seu teor de lípido total é elevado ao fim de 6 dias (16,22%), dentro dos valores referenciados para algumas clorófitas oleaginosas, no entanto diminui com o atingir da fase estacionária. Por outro lado, esta fase é caracterizada por um aumento interessante da produção de exopolissacarídeos.

Relativamente às culturas mistas, os resultados indicam que a cultura mista em que há igual proporção (1:1) de ambas as estirpes favorece a produção de biomassa. Contrariamente, a cultura mista 4:1, com o quádruplo da quantidade de *V. helvetica*, até aos 6 dias revelou-se uma boa estratégia para a produção de lípidos.

Assim sendo, culturas mistas de *V. helvetica* e *A. korschikoffii* poderão ser de grande interesse do ponto de vista lipídico, aos 6 dias e, possivelmente de interesse para a produção de mucilagem, numa fase posterior.

Este trabalho contribui para o desenvolvimento deste tipo de sistemas, uma vez que a bibliografia atual é escassa e que o interesse pela temática começa a aumentar, quer a nível académico, quer a nível industrial. Desta forma, a coprodução de microalgas é uma estratégia muito promissora para a produção de biomassa com valor biotecnológico.

6. Bibliografia

Aburai, N., & Abe, K. (2015). Metabolic switching: synergistic induction of carotenogenesis in the aerial microalga, *Vischeria helvetica*, under environmental stress conditions by inhibitors of fatty acid biosynthesis. *Biotechnology Letters*, *37*(5), 1073–1080. http://doi.org/10.1007/s10529-015-1770-z

Aburai, N., Ohkubo, S., Miyashita, H., & Abe, K. (2013). Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research*, *2*(3), 237–243. http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.001

Amaral R., Eliáš M., Santos L.M.A. and Santos M.F. (2011) Molecular and microscopic evidence place microalgal species of *Characiopsis* into the Eustigmatophyceae. 5EPC, 5th European Phycological Congress, 'Exploring the Phycocosmos: A European Perspective', 4-9 September, Rodos Palace Hotel, Rhodes Island, Greece.

Amaral R., Fawley, K. P., Němcová Y., Ševčíková T., Lukešová A., Santos L.M.A., Fawley M. W., and Eliáš, M. (2015) Diversity and Revised Taxonomy of the Pseudellipsoidion Group - A Recently Recognized Major Clade of Eustigmatophye Algae. European Journal of Phycology 50: 133-133. http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2015.1069493

Amaral R., Martins C.B., Assunção M.F., Santos L.M., Soto S.M., Lombó F., Römling U., Tredici M.R., Ortiz F.L., Jensen H.E., Foster T.J., Rodolfi L., Sosio M., Rodríguez I.R., Vardavoulias M., Vasconcelos V. and Probert I. (2016). Fighting hospital infection with new antibiotic molecules derived from microalgae: the NoMorFilm EU project. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR|International Meeting on Marine Research 2016. doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00002

Amaral, R., Pereira, J. C., Pais, A. A. C. C., & Santos, L. M. A. (2013). Is axenicity crucial to cryopreserve microalgae? *Cryobiology*, *67*(3), 312–320. http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.09.006

Amaral, R., Santos, M. F., & Santos, L. M. A. (2009). Overcoming recalcitrance in *Porphyridium aerugineum* geitler employing encapsulation-dehydration cryopreservation methods. *Cryo-Letters*, *30*(6), 462–472.

Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press.

Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J. M., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., & Farias, W. R. L. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 95–98. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.027

Assunção M.F.G., Ressurreição S., Ferreira J.D., Martins C.B., Amaral R., Santos S., Santos L.M.A. and Varejão J.M.T.B (2014). Screening of antioxidant activity in microalgae. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014. http://doi: 10.3389/conf.fmars.2014.02.00060

Assunção M.F.G, Santos L.M.A and Varejão J.M.T.B (2015). Bioactive compounds from *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K.M. Drew & R. Ross and *Chrysotila lamellosa* P.L. Anand. Conference: XX Cryptogamic Botany Symposium, Porto, Portugal http://doi: 10.13140/RG.2.1.3691.9289

Arkronrat, W., Deemark, P., & Oniam, V. (2016). Growth performance and proximate

composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. & *Tetraselmis* sp.) with monocultures, *38*(1), 1–5.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii* : A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, *22*(3), 245–279. http://doi.org/10.1080/07388550290789513

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press USA.

Becker, W. (2004). Microalgae in Human and Animal Nutrition. In A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 312–351). Blackwell Publishing Ltd. USA.

Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, *70*(1-3), 313–321. http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8

Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, *25*(3), 743–756. http://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9

Bourrelly, P. (1981). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II. Algues jaunes et brunes: Chrysophycées, Pheophycées, Xanthophycées et Diatomées*. Paris: Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Bourrelly, P. (1990). *Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome I: Les Algues Vertes*. Paris: Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Brito, D., Castro, A., Guevara, M., & Aron, N. M. (2013). Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. *Food Technology*, *37*(1), 85–97.

Bruce C. Wainman, Ralph E.H. Smith, Hakumat Rai, A., & Furgal, J. A. (1999). Irradiance and Lipid Production in Natural Algal Populations. In M. T. Arts & B. C. Wainman (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*.

Cardinale, B. J. (2011). Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature*, *472*(7341), 86–89. http://doi.org/10.1038/nature09904

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *146*(1-2 SPEC. ISS.), 60–78. http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007

Carvalho, J. C. M., Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Ferreira-Camargo, L. S., & Sato, S. (2014). Microalgae Bioreactors. In Bakpai, K., Prokop, A., Zappi, M. *Algal Biorefineries: Cultivations of Cell and Production* (pp. 83–126). Springer London.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*, 294–306. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Chisti, Y. (2013). Raceways-based production of algal crude oil. In C. Posten & C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potencial and Production* (pp. 113–146). Walter de Gruyter Germany

Christie, W. W., & Han, X. (2003). *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis* (Fourth). Woodhead Publishing USA. http://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2003.00361.x

Cohen, Z. (1999). *Chemicals from microalgae*. CRC Press UK

Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *48*(6), 1146–1151. http://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006

D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *58*, 832–841. http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162

Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M. De, & Fett, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, *36*(6), 1959–1967. http://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050

Elbein, A. D. (1979). The Role of Lipid-Linked Saccharides in the Biosynthesis of Complex Carbohydrates. *Annual Review of Plant Physiology*, *30*(1), 239–272. http://doi.org/10.1146/annurev.pp.30.060179.001323

Fábregas, J., García, D., Morales, E., Domínguez, A., & Otero, A. (1998). Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *86*(5), 477–481. http://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80155-4

Fawley, K. P., Eliáš, M., & Fawley, M. W. (2014). The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade Goniochloridales. *Journal of Applied Phycology*, *26*(4), 1773–1782. http://doi:10.1007/s10811-013-0216-z

Fernández, F. G. A., Sevilla, J. M. F., & Grima, E. M. (2013). Principles of photobioreactor design. In C. Posten & C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potencial and Production* (pp. 151–179). Walter de Gruyter Germany

Ferreira J.D., Assunção M.F.G., Varejão J.M.T.B. and Santos L.M.A. (2016). Polysaccharide production and antioxidant activity of *Pectodictyon cubicum* Taft, a mucilaginous microalga. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2016. http://doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00001

Ferrentino, J. M., & Farag, I. H. (2006). Microalgal Oil Extraction and in-Situ Transesterification. *The Society of Chemical Engineers*, 1.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. http://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9

Gantar, M., Obreht, Z., & Dalmacija, B. (1991). Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresource Technology*, *36*(2), 167–171. http://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90175-J

Aburai, N., & Abe, K. (2015). Metabolic switching: synergistic induction of carotenogenesis in the aerial microalga, *Vischeria helvetica*, under environmental stress conditions by inhibitors of fatty acid biosynthesis. *Biotechnology Letters*, *37*(5), 1073–1080. http://doi.org/10.1007/s10529-015-1770-z

Aburai, N., Ohkubo, S., Miyashita, H., & Abe, K. (2013). Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research*, *2*(3), 237–243. http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.001

Amaral R., Eliáš M., Santos L.M.A. and Santos M.F. (2011) Molecular and microscopic evidence place microalgal species of *Characiopsis* into the Eustigmatophyceae. 5EPC, 5th European Phycological Congress, 'Exploring the Phycocosmos: A European Perspective', 4-9 September, Rodos Palace Hotel, Rhodes Island, Greece.

Amaral R., Fawley, K. P., Němcová Y., Ševčíková T., Lukešová A., Santos L.M.A., Fawley M. W., and Eliáš, M. (2015) Diversity and Revised Taxonomy of the Pseudellipsoidion Group - A Recently Recognized Major Clade of Eustigmatophye Algae. European Journal of Phycology 50: 133-133. http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2015.1069493

Amaral R., Martins C.B., Assunção M.F., Santos L.M., Soto S.M., Lombó F., Römling U., Tredici M.R., Ortiz F.L., Jensen H.E., Foster T.J., Rodolfi L., Sosio M., Rodríguez I.R., Vardavoulias M., Vasconcelos V. and Probert I. (2016). Fighting hospital infection with new antibiotic molecules derived from microalgae: the NoMorFilm EU project. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR|International Meeting on Marine Research 2016. doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00002

Amaral, R., Pereira, J. C., Pais, A. A. C. C., & Santos, L. M. A. (2013). Is axenicity crucial to cryopreserve microalgae? *Cryobiology*, *67*(3), 312–320. http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.09.006

Amaral, R., Santos, M. F., & Santos, L. M. A. (2009). Overcoming recalcitrance in *Porphyridium aerugineum* geitler employing encapsulation-dehydration cryopreservation methods. *Cryo-Letters*, *30*(6), 462–472.

Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press.

Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J. M., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., & Farias, W. R. L. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 95–98. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.027

Assunção M.F.G., Ressurreição S., Ferreira J.D., Martins C.B., Amaral R., Santos S., Santos L.M.A. and Varejão J.M.T.B (2014). Screening of antioxidant activity in microalgae. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014. http://doi: 10.3389/conf.fmars.2014.02.00060

Assunção M.F.G, Santos L.M.A and Varejão J.M.T.B (2015). Bioactive compounds from *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K.M. Drew & R. Ross and *Chrysotila lamellosa* P.L. Anand. Conference: XX Cryptogamic Botany Symposium, Porto, Portugal http://doi: 10.13140/RG.2.1.3691.9289

Arkronrat, W., Deemark, P., & Oniam, V. (2016). Growth performance and proximate

composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. & *Tetraselmis* sp.) with monocultures, *38*(1), 1–5.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii* : A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, *22*(3), 245–279. http://doi.org/10.1080/07388550290789513

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press USA.

Becker, W. (2004). Microalgae in Human and Animal Nutrition. In A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 312–351). Blackwell Publishing Ltd. USA.

Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, *70*(1-3), 313–321. http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8

Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, *25*(3), 743–756. http://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9

Bourrelly, P. (1981). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II. Algues jaunes et brunes: Chrysophycées, Pheophycées, Xanthophycées et Diatomées*. Paris: Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Bourrelly, P. (1990). *Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome I: Les Algues Vertes*. Paris: Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Brito, D., Castro, A., Guevara, M., & Aron, N. M. (2013). Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. *Food Technology*, *37*(1), 85–97.

Bruce C. Wainman, Ralph E.H. Smith, Hakumat Rai, A., & Furgal, J. A. (1999). Irradiance and Lipid Production in Natural Algal Populations. In M. T. Arts & B. C. Wainman (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*.

Cardinale, B. J. (2011). Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature*, *472*(7341), 86–89. http://doi.org/10.1038/nature09904

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *146*(1-2 SPEC. ISS.), 60–78. http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007

Carvalho, J. C. M., Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Ferreira-Camargo, L. S., & Sato, S. (2014). Microalgae Bioreactors. In Bakpai, K., Prokop, A., Zappi, M. *Algal Biorefineries: Cultivations of Cell and Production* (pp. 83–126). Springer London.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*, 294–306. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Chisti, Y. (2013). Raceways-based production of algal crude oil. In C. Posten & C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potencial and Production* (pp. 113–146). Walter de Gruyter Germany

Christie, W. W., & Han, X. (2003). *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis* (Fourth). Woodhead Publishing USA. http://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2003.00361.x

Cohen, Z. (1999). *Chemicals from microalgae*. CRC Press UK

Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *48*(6), 1146–1151. http://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006

D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *58*, 832–841. http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162

Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M. De, & Fett, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, *36*(6), 1959–1967. http://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050

Elbein, A. D. (1979). The Role of Lipid-Linked Saccharides in the Biosynthesis of Complex Carbohydrates. *Annual Review of Plant Physiology*, *30*(1), 239–272. http://doi.org/10.1146/annurev.pp.30.060179.001323

Fábregas, J., García, D., Morales, E., Domínguez, A., & Otero, A. (1998). Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *86*(5), 477–481. http://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80155-4

Fawley, K. P., Eliáš, M., & Fawley, M. W. (2014). The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade Goniochloridales. *Journal of Applied Phycology*, *26*(4), 1773–1782. http://doi:10.1007/s10811-013-0216-z

Fernández, F. G. A., Sevilla, J. M. F., & Grima, E. M. (2013). Principles of photobioreactor design. In C. Posten & C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potencial and Production* (pp. 151–179). Walter de Gruyter Germany

Ferreira J.D., Assunção M.F.G., Varejão J.M.T.B. and Santos L.M.A. (2016). Polysaccharide production and antioxidant activity of *Pectodictyon cubicum* Taft, a mucilaginous microalga. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2016. http://doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00001

Ferrentino, J. M., & Farag, I. H. (2006). Microalgal Oil Extraction and in-Situ Transesterification. *The Society of Chemical Engineers*, 1.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. http://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9

Gantar, M., Obreht, Z., & Dalmacija, B. (1991). Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresource Technology*, *36*(2), 167–171. http://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90175-J

Gao, B., Yang, J., Lei, X., Xia, S., Li, A., & Zhang, C. (2015). Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *Journal of Applied Phycology*. http://doi.org/10.1007/s10811-015-0626-1

Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., & Simões, M. (2016). Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, *200*, 279–286. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.023

Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, *21*(5), 493–507. http://doi.org/10.1007/s10811-008-9392-7

Griffiths, M. J., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5), 989–1001. http://doi.org/10.1007/s10811-011-9723-y

Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2012). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In Z. Muchlisin (Ed.), *Aquaculture*. InTech. http://doi.org/10.5772/30576

Gurr, M., Harwood, J., & Frayn, K. (2002). Lipid biochemistry: an introduction. *Blackell Publishing* UK. http://doi.org/ISBN:1405129190

Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, *45*(2), 160–186. http://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001

Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(3), 1037–1047. http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004

Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, *91*(6), 679–684. http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004

Hempel, N., Petrick, I., & Behrendt, F. (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, *24*(6), 1407–1418. http://doi.org/10.1007/s10811-012-9795-3

Hibberd, D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *82*(2), 93–119. http://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1981.tb00954.x

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, *54*(4), 621–639. http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x

Huerlimann, R., de Nys, R., & Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering*, *107*(2), 245–257. http://doi.org/10.1002/bit.22809

Iverson, S. J., Lang, S. L., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, *36*(11),

1283–1287. http://doi.org/10.1007/s11745-001-0843-0

Johnson, K. R., & Admassu, W. (2012). Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *88*(6), 992–998. http://doi.org/10.1002/jctb.3943

Kannan, D. C., & Pattarkine, V. M. (2014). Recovery of Lipids from Algae. In Karesh, B., Prokop, A., Zappi, M., *Algal Biorefineries: Cultivations of Cell and Production* (pp. 297–310). Springer USA

Koreivienė, J., Valčiukas, R., Karosienė, J., & Baltrėnas, P. (2014). Testing of *Chlorella/Scenedesmus* microalgae consortia for remediation of wastewater, CO_2 mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, *22*(2), 105–114. http://doi.org/10.3846/16486897.2013.911182

Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. In H. Domínguez, *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 87–134). Elsevier. http://doi.org/10.1533/9780857098689.1.87

Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., & Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 124. http://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124

Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, *12*, 497–512. http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004

Lee, R. E. (2008). *Phycology*. USA: Cambridge University Press. http://doi.org/10.1017/CBO9780511812897.002

Leonardi, P. I., Rodríguez, M. C., & Cáceres, E. J. (2000). Fine structure of biflagellate zoospores of *Asterococcus superbus* (Tetrasporales, Chlorophyceae), including the absolute configuration of the flagellar apparatus. *Journal of Phycology*, *36*(4), 714–722. http://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99074.x

Li, Y., Ghasemi Naghdi, F., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., … Schenk, P. M. (2014). A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories*, *13*, 14. http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14

Li, Z., Sun, M., Li, Q., Li, A., & Zhang, C. (2012). Profiling of carotenoids in six microalgae (Eustigmatophyceae) and assessment of their β-carotene productions in bubble column photobioreactor. *Biotechnology Letters*, *34*(11), 2049–2053. http://doi.org/10.1007/s10529-012-0996-2

Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, *1217*(16), 2383–2389. http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232. http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020

Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V, Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, *49*(5), 1137–46. http://doi.org/10.1194/jlr.D700041-JLR200

Mercer, P., Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*(5), 539–547. http://doi.org/10.1002/ejlt.201000455

Metting Jr, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *17*(5-6), 477–489. http://doi.org/10.1007/BF01574779

Miller, M. R., Quek, S. Y., Staehler, K., Nalder, T., & Packer, M. A. (2012). Changes in oil content, lipid class and fatty acid composition of the microalga *Chaetoceros calcitrans* over different phases of batch culture. *Aquaculture Research*, *45*(10), 1634–1647. http://doi.org/10.1111/are.12107

Mingazzini, M., & Palumbo, M. T. (2015). Open Mass Cultures of Marine Microalgae for Biodiesel Production : Laboratory Approach to Study Species Competition in Mixed Cultures. *Natural Resources* 6, 174–180.

Mubarak, M., Shaija, A., & Suchithra, T. V. (2015). A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, *7*, 117–123. http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.008

Nakazawa, A., Yamada, T., & Nozaki, H. (2004). Taxonomic study of *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on comparative morphology and rbcL gene sequences. *Phycologia*, *43*(6), 711–721.

Nalder, T. D., Miller, M. R., & Packer, M. A. (2015). Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis* sp (T-Iso) grown in batch culture. *Aquaculture International*, *23*(5), 1293–1312. http://doi.org/10.1007/s10499-015-9884-9

Nalley, J. O., Stockenreiter, M., & Litchman, E. (2014). Community Ecology of Algal Biofuels: Complementarity and Trait-Based Approaches. *Industrial Biotechnology*, *10*(3), 191–201. http://doi.org/10.1089/ind.2013.0038

Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Nascimento, M. A. (2013). Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Research*, *6*(1), 1–13. http://doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan USA.

Novoveská, L., Franks, D. T., Wulfers, T. A., & Henley, W. J. (2016). Stabilizing continuous mixed cultures of microalgae. *Algal Research*, *13*, 126–133. http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.021

O'Reilly, A. M., & Scott, J. A. (1995). Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*(7), 636–646. http://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00103-X

Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, *20*(4-6), 459–466. http://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00076-5

Olmstead, I. L. D., Hill, D. R. A., Dias, D. A., Jayasinghe, N. S., Callahan, D. L., Kentish, S. E., Martin, G. J. O. (2013). A quantitative analysis of microalgal lipids for optimization of biodiesel and omega-3 production. *Biotechnology and Bioengineering*, *110*(8), 2096–2104. http://doi.org/10.1002/bit.24844

Osório, H. C., Laranjeiro, C. N., Santos, L. M. A., & Santos, M. F. (2004). First attempts to cryopreserve strains from the Coimbra Collection of Algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability. *Nova Hedwigia*, *79*(1-2), 227–235. http://doi.org/10.1127/0029-5035/2004/0079-0227

Ott, D. W., Oldham-Ott, C. K., Rybalka, N., & Friedl, T. (2015). Xanthophyte, Eustigmatophyte, and Raphidophyte Algae. In J. D. Wehr, R. G. Sheath, & J. P. Kociolek (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier USA.

Parrish, C. C. (1999). Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples. In M. Arts & B. Wainman (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer USA.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, *45*(1), 11–36. http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037

Phatarpekar, P. V, Phatarpekar, P. V, Sreepada, R., Sreepada, R., Pednekar, C., Pednekar, C., Achuthankutty, C. T. (2000). A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*, *181*, 141–155. http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00227-6

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *40*(8), 781–796. http://doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7

Ptacnik, R., Solimini, A. G., Andersen, T., Tamminen, T., Brettum, P., Lepisto, L., Rekolainen, S. (2008). Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(13), 5134–5138. http://doi.org/10.1073/pnas.0708328105

Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(6), 635–648. http://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x

Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., & Arumugam, M. (2015). Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. *Frontiers in Energy Research*, *2*, 1–9. http://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061

Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(1), 100–112. http://doi.org/10.1002/bit.22033

Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2008). Fractionation of lipids and purification of γ-linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, *109*(3), 580–586. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.005

Santos, L.M.A. (1996). The Eustigmatophyceae: actual knowledge and research perspectives.

Nova Hedwigia, Beiheft, *112*, 391–405. http://doi.org/0078-2238/96/0112-0391

Santos, L.M.A., & Leedale, G. F. (1991). *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae): ultrastructure of the zoospores, with special reference to the flagellar apparatus. *Protoplasma*, *164*(1-3), 160–167. http://doi.org/10.1007/BF01320821

Santos, L. M. A., & Santos, M. F. (2004). The Coimbra Culture Collection of Algae (ACOI). *Nova Hedwigia*, *79*(1-2), 39–47. http://doi.org/10.1127/0029-5035/2004/0079-0039

Sathish, A., Sims, R. C., & Wood, B. (2012). Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. *Bioresource Technology*, *118*, 643–647. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.118

Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(3), 277–286. http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005

Shubert, E., & Gärtner, G. (2015). Nonmotile Coccoid and Colonial Green Algae. In J. D. Wehr, R. G. Sheath, & J. P. Kociolek (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier USA.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96. http://doi.org/10.1263/jbb.101.87

Stockenreiter, M., Haupt, F., Graber, A. K., Seppälä, J., Spilling, K., Tamminen, T., & Stibor, H. (2013). Functional group richness: Implications of biodiversity for light use and lipid yield in microalgae. *Journal of Phycology*, *49*(5), 838–847. http://doi.org/10.1111/jpy.12092

Striebel, M., Behl, S., & Stibor, H. (2009). The coupling of biodiversity and productivity in phytoplankton communities: consequences for biomass stoichiometry coupling of biodiversity and productivity in phytoplankton communities: consequences for biomass stoichiometry. *Ecology*, *90*(8), 2025–2031.

Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, *99*(10), 4021–4028. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046

Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C. (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science and Technology*, *42*(1), 81–92. http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004

Wehr, J. D., Sheath, R. G., & Kociolek, J. P. (2015). *Freshwater Algae of North America*. *Freshwater Algae of North America*. Elsevier USA.

Whittle, S. J., & Casselton, P. J. (1975). The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. II. Xanthophyceae. *British Phycological Journal*, *10*(2), 192–204. http://doi.org/10.1080/00071617500650181