



UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
DA TERRA E DO MAR
Curso de Oceanografia

**Avaliação qualitativa dos ácidos graxos produzidos pela
diatomácea *Skeletonema costatum* em diferentes condições de
cultivo**

Ac: Débora Hackbart Conde

Orientador: Márcio da Silva Tamanaha, Mestre

Itajaí, Novembro/2011



UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
DA TERRA E DO MAR
Curso de Oceanografia

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação qualitativa dos ácidos graxos produzidos pela diatomácea *Skeletonema costatum* em diferentes condições de cultivo

Monografia apresentada à banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso de Oceanografia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Oceanógrafo.

Itajaí, Novembro/2011

DEDICATÓRIA

À minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Márcio pela orientação e amizade durante a realização desse trabalho.

Aos técnicos do LAMA, Thiago e César pelo auxílio na realização dos cultivos no laboratório.

Ao professor André Lima pela avaliação do trabalho e pelas contribuições.

Ao professor Francisco Deschamps pelas análises químicas, pelos conselhos e contribuições na avaliação do trabalho.

Aos meus pais Danilo e Ruth pelo apoio e incentivo para cursar oceanografia, pela orientação e dedicação a cada erro e acerto, por sempre serem tão presentes e tão unidos, sempre serão um exemplo pra mim.

Às minhas irmãs Ângela e Míriam pela amizade.

Ao Luciano, companheiro de faculdade desde o primeiro semestre, meu muito obrigado pela parceria, amizade, compreensão, paciência e por tudo que aprendi durante nosso relacionamento.

Aos meus amigos, que, felizmente são tantos que não daria para citar todos, meus amigos do RS que sempre fazem parte da minha mesmo longe, Mayra e Kelly vocês são minhas comadres, minhas melhores amigas, obrigada sempre por acreditarem no meu potencial e por me aceitarem sempre me amando muito, amo vocês e as minhas afilhadas lindas que são como filhas pra mim desde que nasceram.

Aos amigos que fiz em SC, em especial a Cissa e Gari que me acolheram nesse final de curso sempre me apoiando muito, meu muito obrigado, se eu consegui terminar meu trabalho nesse semestre foi também pela ajuda de vocês, sorte de quem tem mais de uma família, como eu tenho.

Aos professores que tive durante o curso, sou muito grata pelas lições profissionais e pessoais que tive durante essa jornada, em especial àqueles que, se dedicam e mais cobram de nós alunos, pois assim enriquecem nosso crescimento.

Ao pessoal do laboratório de química orgânica, pelos ótimos semestres de monitoria, onde aprendi muito e fiz muitos amigos, à Déia sempre disposta a ensinar, à professora Márcia que acredita muito em mim, admiro muito vocês.

RESUMO

As microalgas são amplamente estudadas pela sua importância ecológica, nutricional e econômica. São cultivadas principalmente para a finalidade de suplemento alimentar, uso em aquicultura e extração de produtos de alto valor comercial, principalmente proteínas e carboidratos, embora muitos estudos tenham enfatizado a otimização das condições de cultivo para se obter um rendimento maior de certas substâncias. A síntese de lipídios por esses microrganismos se destaca por apresentar maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores, sendo eficientes fixadoras de CO₂. A maior porção dos lipídios é composta por ácidos graxos de alto valor e com diversas aplicabilidades comerciais. O presente estudo avaliou o crescimento e a composição de ácidos graxos da microalga *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) em cinco tratamentos variando a concentração de nitrogênio do meio de cultura utilizado f/2 75% e 50% de NaNO₃ que estabelece a formulação padrão do meio; a salinidade 30 e 25 e com aeração, com temperatura de 20 ± 2°C, luminosidade de 80 μE.cm⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro todos cultivos com 7 dias de duração. Não foram observadas diferenças no perfil de crescimento entre os tratamentos, com exceção do que recebeu aeração no sistema, onde foi encontrado maior valor de densidade celular. Considerando o perfil de ácidos graxos, em todos os tratamentos, foram identificados os seguintes ácidos graxos com maior abundância relativa: palmítico, mirístico, palmitoleico e EPA. A porcentagem relativa do EPA no tratamento com aeração foi de 23% sendo bem superior aos outros tratamentos que apresentaram em média 5% desse ácido graxo.

Palavras-chaves: *Skeletonema costatum*, crescimento, ácidos graxos

ABSTRACT

Keywords:

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Sumário.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
1 Introdução.....	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Geral	3
1.1.2 Específicos	3
2 Fundamentação Teórica	4
2.1 Aplicações dos cultivos microalgais	4
2.2 Divisões e classes das microalgas.....	5
2.2.1 Classe Bacillariophyceae	6
2.3 Condições de cultivo.....	8
2.4 Crescimento microalgal	10
2.5 Lipídios.....	12
2.5.1 Lipídios microalgas.....	13
3 Metodologia.....	15
3.1 Obtenção e manutenção da cepa	15
3.2 Cultivos	16

3.2.1	Determinações analíticas	18
3.2.2	Extração lipídica e análise do perfil de ácidos graxos.....	19
4	Resultados e Discussão.....	20
4.1	Avaliação do crescimento.....	20
4.1.2	Curvas de Crescimento	20
4.2	Avaliação qualitativa dos ácidos graxos.....	24
4.2.1	Perfil dos ácidos graxos	24
5	Considerações Finais.....	28
6	Referências	29

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE TAXA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS EM CULTURA.....	10
FIGURA 2. PREPARO DOS INÓCULOS.....	16
FIGURA 3. FOTO DEMONSTRATIVA DA ESTRUTURA DOS CULTIVOS.....	17
FIGURA 4. TAXA DE CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DOS DADOS DE CLOROFILA A E DENSIDADE DE CELULAS DO TRATAMENTO COM 75% DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO (NITRATO) EM RELAÇÃO AO CONTROLE E SALINIDADE 30.....	21
FIGURA 5. TAXA DE CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DOS DADOS DE CLOROFILA A E DENSIDADE DE CELULAS DO TRATAMENTO COM 50% DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO (NITRATO) EM RELAÇÃO AO CONTROLE E SALINIDADE 30.....	21
FIGURA 6. TAXA DE CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DOS DADOS DE CLOROFILA A E DENSIDADE DE CELULAS DO TRATAMENTO COM SALINIDADE 30, COM CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO PADRÃO.....	22
FIGURA 7. TAXA DE CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DOS DADOS DE CLOROFILA A E DENSIDADE DE CELULAS DO TRATAMENTO COM SALINIDADE 25, COM CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO PADRÃO.....	22
FIGURA 8. TAXA DE CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DOS DADOS DE CLOROFILA A E DENSIDADE DE CELULAS DO TRATAMENTO COM SALINIDADE 30 CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO (NITRATO) PADRÃO E AERAÇÃO.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPARATIVO DO RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE ÓLEOS ENTRE ALGUMAS OLEAGINOSAS E MICROALGAS.....	4
TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS.....	11
TABELA 3. MODO DE PREPARO DO MEIO DE CULTURA f/2.....	15
TABELA 4. MÉDIA DAS PERCENTAGENS DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO PERFIL.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – ácidos graxos

AGPI – ácidos graxos poliinsaturados

AGMI – ácidos graxos monoinsaturados

DHA – ácido graxo docosahexaenoico

EPA – ácido graxo eicosapentaenóico

PUFAs – Polyunsaturated Fatty Acid

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (TORTORA, 2000).

As microalgas são encontradas no ambiente marinho, em água doce e no solo, podem se apresentar como células isoladas, agrupadas formando colônias ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de células, em todos os casos ocorre pouca ou nenhuma especialização das células, cada célula realiza todas as funções vitais. O termo microalga é desprovido de valor taxonômico, pois designa organismos muito distintos entre si quanto à origem, composição e morfologia (NORTON et al., 1996; LOURENÇO, 2006).

Segundo Tomaselli (2004), as microalgas são classificadas a partir de alguns critérios como a natureza química dos produtos de reserva, diferentes tipos de pigmentos e segundo os constituintes da parede celular bem como também aspectos como critérios citológicos e morfológicos.

Essa diversidade também se reflete na composição bioquímica, dando as microalgas, a qualidade de fonte ilimitada de bioprodutos (PULZ & GROSS, 2004). Além da potencialidade da diversidade das substâncias produzidas, outros fatores como a alta produtividade, o rápido crescimento e as diferentes formas de cultivos das espécies são responsáveis pelo interesse de cultivos intensos de microalgas que vem sendo utilizados para alimentação de animais aquáticos como forma de suplementação alimentar, fonte de pigmentos, adubos orgânicos e estão sendo indicadas como uma potencial matéria prima para produção de biocombustíveis devido ao alto teor lipídico que algumas espécies apresentam e ao perfil de ácidos graxos (OHSE, 2009).

A descoberta desse alto valor nutricional das microalgas, ricas em proteínas, lipídeos, carboidratos, assim como vitaminas, enzimas, carotenóides, entre outras fez com que houvesse muito interesse nas pesquisas relacionadas ao uso das microalgas como alimento para organismos cultiváveis e também para suplementação na dieta humana. Os ácidos graxos nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os poliinsaturados (PUFA's) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BROWN et al., 1997). Embora o melhor aproveitamento no cultivo desses microrganismos seja para produção de carboidratos e proteínas segundo Becker (2005), as condições de cultivo podem ser otimizadas para maior rendimento do produto de interesse, pois uma

mesma espécie pode apresentar perfis químicos diferentes, de acordo com as condições empregadas no cultivo (LOURENÇO, 2006; DERNER *et al*, 2006). O conteúdo bioquímico também pode variar de acordo com a idade da cultura, o efeito dessas variações são temas de diversas pesquisas para entender melhor a fisiologia, como também para responder perguntas pertinentes quanto ao cultivo massivo e nutrição de herbívoros (LOURENÇO *et al.*, 1997).

As diatomáceas (classe Bacillariophyceae) ocorrem tanto em águas salgadas quanto doce, possuem frústula silicosa como característica própria da classe. A principal substância de reserva é a crisolaminarina (glicano β 1-3 ramificado em β 1-6) um polissacarídeo solúvel (REVIERS, 2006). As células também podem acumular gotículas de gordura, tanto como material de reserva quanto como estratégia para aumentar sua flutuabilidade na coluna d'água, o que faz com que espécies dessa classe sejam potenciais microorganismos produtores de lipídios (LOURENÇO, 2006).

No entanto, a indústria da biotecnologia microalgal necessita continuar desenvolvendo mercado para os produtos algais, pois o uso destes microorganismos está estabelecido como fonte de valiosos compostos e nos próximos anos deverá acontecer uma contínua expansão no número de produtos comercialmente disponíveis empregando estes recursos. Há uma necessidade de quantificação do efeito de determinadas condições de cultivo no metabolismo microalgal e na produção dos compostos de interesse, o que exige estudos para conhecimento sobre espécies produtoras assim como sobre os fatores que influenciam o crescimento e composição bioquímica destas (PULZ e GROSS, 2004).

Diante das potencialidades de síntese de compostos das microalgas este trabalho aborda um estudo para avaliar qualitativamente os ácidos graxos produzidos pela diatomácea *S. costatum* em diferentes condições de cultivo na tentativa de descrever alternativas para uma maior produtividade de biomassa juntamente com um maior rendimento do composto de interesse.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Analisar o perfil da composição qualitativa dos ácidos graxos da diatomácea marinha *Skeletonema costatum*, em diferentes condições de cultivo.

1.1.2 Específicos

- Analisar o crescimento de *S. costatum* em diferentes condições de cultivos;
- Identificar a composição qualitativa de ácidos graxos de *S. costatum* nas diferentes condições de cultivo através de cromatografia gasosa;
- Verificar se há diferença na composição dos ácidos graxos produzidos em diferentes condições de cultivo;

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 APLICAÇÕES DOS CULTIVOS MICROALGAIS

A principal aplicação do cultivo microalgal é a produção de suplementos alimentares e as principais espécies cultivadas para esse fim são do gênero: *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella* (BECKER, 1995). A produção comercial de microalgas teve início na década de 60 com espécies de *Chlorella* e *Spirulina*, como suplementos dietéticos, *Dunaliella salina* para obtenção de β -caroteno, *Haematococcus pluviialis* para produção de astaxantina e diversas outras espécies para aplicação na aquicultura (BENEMAN, 1990). A biomassa produzida destina-se às mais diversas aplicações como, produção de proteína unicelular, lipídios, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas (DURAND-CHASTEL, 1980; BECKER, 1995; PULZ e GROSS, 2004; RICHMOND, 2004). Estudos recentes têm explorado o uso de microalgas para obtenção de lipídios, principalmente os de maior valor comercial (COSTA, *et al.*, 2006), pois apresentam elevadas produtividades em biomassa seca, o que representa menor gasto de área para o cultivo (TEIXEIRA; MORALES, 2006); o solo pode estar degradado, já que o mesmo é somente utilizado como suporte para o sistema de cultivo; a produção da biomassa é contínua, não segue regime de safras; o meio de cultivo (que é aquoso) pode ser reaproveitado e como fontes de carbono podem ser utilizados o CO_2 residual de outros processos (BENEMANN, 1990) e fontes orgânicas residuais. As microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e são eficientes fixadoras de CO_2 (BROWN; ZEILER, 1993). Portanto, são várias as vantagens do cultivo de microalgas em relação ao cultivo de oleaginosas; em relação, por exemplo, ao dendê, a oleaginosa de maior produtividade, as microalgas podem apresentar uma produtividade em óleo pelo menos cinco vezes superior, conforme tabela 1.

Rendimento de óleo t/ha ano	
Mamona	0,5 - 1,0
Soja	0,2- 0,6
Girassol	0,5 -1,5
Canola	0,5 - 0,9
Pinhão manso	2,0 - 3,0
Óleo de palma (dendê)	3,0 - 6,0
Microalgas	50 - 150

Tabela 1. Comparativo do rendimento da produção de óleos entre algumas oleaginosas e microalgas.

Fonte: (Pérez. H. 2007)

Apesar de ser uma atividade consolidada em alguns países a produção comercial de microalgas no Brasil somente é realizada por empresas que produzem a biomassa e a empregam na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos, por exemplo. Não há informações da produção em grande escala para a obtenção de biomassa ou para extração de compostos bioativos visando aplicações diferentes, somente existem iniciativas de caráter experimental em centros de pesquisas distintos e, em geral, trabalhando isoladamente (DERNER, 2006b).

A principal finalidade de aplicação desses organismos é como fonte alimentar primária de alimentos para larvas, juvenis e até de adultos de peixes, moluscos e crustáceos, também como na dieta do zooplâncton utilizado para alimentar peixes e crustáceos (GOMES, 1986).

A seleção de espécies de microalgas usadas como alimento na larvicultura é fator chave para o sucesso da produtividade. O cultivo de microalgas no Brasil tem sido popularizado graças à aplicação na atividade aquícola, embora sejam ainda realizadas com pequeno número de espécies, pois há necessidade de conhecimento mais detalhado da biologia da espécie a ser empregada que precisa ser dotada de características como crescimento rápido, volume celular adequado e composição química favorável às necessidades nutricionais do animal cultivado. As espécies mais utilizadas na aquíicultura marinha são dos gêneros: *Thlassiosira*, *Skeletonema*, *Chaetoceros* (diatomáceas), *Isochrysis*, *Pavlova* (primnesiofíceas), *Tetraselmis* (prasinofíceas), *Dunaliella* (clorofíceas) e *Nannochloropsis* (eustigmatofíceas). Em água doce, pertencem aos gêneros: *Chlorella* (trebouxiófíceas), *Scenedesmus* e *Haematococcus* (clorofíceas) (BROWN et al., 1997, LOURENÇO, 2006).

2.2 DIVISÕES E CLASSES DAS MICROALGAS

Existem três divisões principais onde estão classificados os protistas fotossintetizantes unicelulares: Euglenophyta (Euglenófitas), Pyrrhophyta (Dinoflagelados) e Chrysophyta (Crisófitas). As crisófitas são subdivididas em três classes: Chrysophyceae (algas douradas), Xanthophyceae (algas verde-amareladas) e classe Bacillariophyceae (diatomáceas) (RAVEN, 1996). Em geral as crisófitas são organismos unicelulares autotróficos, abundantes tanto em ambientes marinhos quanto em águas continentais. Possui clorofila “a” e “c”, cuja cor pode ser mascarada, principalmente nos representantes da classe Bacillariophyceae, pelo pigmento acessório fucoxantina, um carotenóide de cor castanho-dourado. Apresentam como principal carboidrato de reserva a crisolaminarana. (RAVEN, 1996).

2.2.1 Classe Bacillariophyceae

Nos oceanos, as classes Bacillariophyceae (diatomáceas) e Dinophyceae (dinoflagelados) são as formas vegetais mais abundantes e representativas, tanto em número de indivíduos, quanto em espécies (BONECKER; BONECKER; BASSANI, 2002). As diatomáceas se diferenciam da maioria das demais microlagas por sua parede celular inorgânica, chamada de frústula, refinamente esculpida. A frústula é composta de sílica polimerizada ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) e está dividida em duas metades (valvas) que se encaixam como uma placa de Petri. A valva maior da frústula é denominada epiteca e a valva menor de hipoteca (RAVEN, 1996). Segundo Round et al, (1990) a classe compreende 285 gêneros envolvendo 10.000 – 12.000 espécies conhecidas. As células de diatomáceas variam desde 2,0 μm (picoplâncton) até 2,0 mm de diâmetro (mesoplâncton). Apresentam núcleo mais ou menos centralizado. Os plastos apresentam clorofilas *a* e *c*, β - caroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina como seus principais pigmentos fotossintéticos. Apesar de o carboidrato crisolaminarano ser o principal produto de reserva das diatomáceas, estas também apresentam gotículas de óleo como reserva energética no citoplasma que também tem a função de contribuir para o controle do posicionamento das células na coluna d'água, o acúmulo de óleo diminui sua densidade aumentando a flutuabilidade, estratégia ecológica visto a presença da frústula e ausência de flagelos (LOURENÇO, 2006).

A principal forma de reprodução entre as diatomáceas é a reprodução assexuada por divisão celular, onde uma célula se divide em duas. Quando ocorre a divisão celular, as valvas da célula mãe serão sempre as epitecas (valva maior) das células filhas que produzirá as novas hipotecas (valva menor). Este tipo de reprodução faz com que as células diminuam de tamanho durante várias divisões celulares. Quando os indivíduos da espécie chegam a uma redução de cerca de 30% do tamanho inicial pode ocorrer reprodução sexuada. Na reprodução sexuada, após a fecundação dos gametângios femininos pelos masculinos, o auxósporo resultante, ou zigoto, desenvolve-se até atingir o tamanho característico da espécie. Uma vez adulto, o auxósporo se divide e produz novas frústulas idênticas às células parentais (LOURENÇO, 2006).

2.2.1.1 *Skeletonema costatum*

POSICIONAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE CULTIVADA (GUIRY, 2011)

Divisão Ochrophyta

Classe Bacillariophyceae

Ordem Centrales

Família Coscinodiscaceae

Gênero Skeletonema

Skeletonema costatum (Greville) Cleve 1873

A espécie *S. costatum* possui células cilíndricas, 2-21 µm de diâmetro, unidas em longas cadeias por tubos externos arranjados em um anel marginal (processos estruturais). Esses processos periféricos são alinhados paralelamente ao eixo longitudinal da célula e se liga a processos semelhantes de valvas adjacentes (semelhantes a espinhos), formando colônias permanentes de comprimento variável, possui dois cloroplastos por célula (HASLE, 1996). Quanto à distribuição, é uma espécie cosmopolita em regiões costeiras ao redor do mundo, exceto em mares polares.

Essa microalga do gênero *Skeletonema* é considerada uma das diatomáceas mais abundantes no fitoplâncton marinho, é considerada uma espécie cosmopolita, pois é comprovada a ocorrência em zonas costeiras do mundo todo, exceto em mares polares. O gênero *skeletonema* foi estabelecido por Greville (1865) *apud* (MARINS, 2007), com descrição da *skeletonema barbadensis* através de análise de um depósito de espécies extintas em Barbados. Cleve em 1873 registrou a presença de uma espécie em material do mar de Java reconhecendo semelhanças com a *skeletonema barbadensis*, transferindo a espécie para o gênero *skeletonema* Greville, com o nome *skeletonema costatum* (Greville) Cleve. Muitos estudos são realizados com esse gênero na biologia celular, ecotoxicologia, bioacumulação de substâncias e bioindicação ambiental no mundo todo. O trabalho de Morozova; Orlova (2005) *apud* (MARINS, 2007), menciona a espécie *S. costatum* como indicadora de ambientes eutrofizados ao observarem um aumento de três vezes na densidade celular dessa espécie em uma área na baía de Vostov, no Japão após a instalação de uma fazenda marinha no local. Allen & Nelson (1910) isolaram e cultivaram diatomáceas dos gêneros: *Skeletonema*, *Chaetoceros* e *Thalassiosira* para alimentação de

larvas de invertebrados, marcando o início das atividades científicas de alimentação na larvicultura.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Conforme a fonte de carbono empregada e a utilização ou não de energia luminosa, os cultivos podem ser classificados em: Autotrófico (luz como exclusiva fonte energética); Heterotrófico (uso exclusivo de compostos orgânicos sem a utilização de luz); Mixotrófico (uso simultâneo de uma fonte luminosa e substrato orgânico como fonte de energia, bem como o CO₂ e o substrato orgânico como fonte de carbono).

A temperatura é um dos fatores que mais afetam o metabolismo dos organismos. No ambiente de cultivo a temperatura deve ser mantida constante a fim de proporcionar mais estabilidade para o desenvolvimento das culturas por isso a importância da climatização da sala de manutenção dos cultivos. A iluminação também requer atenção especial para o sucesso da cultura, o mais comumente utilizado é a iluminação artificial fluorescente, as lâmpadas de 40 W são mais usadas pela relação de espaço útil e potência. Geralmente o regime de fotoperíodo é necessário, 12 horas de luz: 12 horas de escuro é o mais comumente empregado, outros fotoperíodos são utilizados, depende do objetivo do cultivo, iluminação contínua é mais utilizada em escalas comerciais. A radiação luminosa incidente sobre os cultivos precisa ser medida por meio de um irradiômetro a fim de manter um controle da densidade de fluxo fotônico, geralmente de 60 a 70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LOURENÇO, 2006).

A salinidade pode afetar o crescimento e a composição celular das microalgas, cada espécie tem uma concentração de salinidade ótima, a variação desse parâmetro causa um estress osmótico e iônico e das modificações nas proporções iônicas celulares devido à permeabilidade seletiva da membrana aos íons (MATA, 2010).

O carbono é um elemento de alta demanda fisiológica para as células devido ao fato de todas as substâncias orgânicas sintetizadas (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, etc) constitui o carbono na sua composição. No meio natural o carbono não é um fator limitante devido a sua alta solubilidade na água do mar e aos processos de reciclagem de matéria orgânica no ambiente pelágico, tornando-o sempre disponível. Já em cultivos densos pode vir a ser limitante, pois diversos meios de cultura não têm carbono na sua composição e a difusão natural de CO₂ (aproximadamente 0,036% de CO₂) mostra-se ineficiente para suprir a demanda em cultivos densos, este problema pode ser sanado com adição de 1 a 5% de CO₂ na aeração do cultivo. O emprego de fontes suplementares de carbono (CO₂, glicose, acetato de sódio, bicarbonato) pode potencializar a

taxa de crescimento, gerar uma maior biomassa e maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados influenciando na quantidade de lipídios e no grau de insaturação dos ácidos graxos (CERÓN GARCÍA et al., 2005).

A aeração em um cultivo é importante não só para a adição de CO₂, mas também para promover agitação no meio assegurando as mesmas condições de crescimento para as células, esse suprimento de CO₂ também promove um equilíbrio do pH, já que quando o CO₂ é retirado do meio há um aumento do pH.

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de microalgas marinhas podem ser divididos em três classes, conforme a composição química: definidos, semidefinidos e indefinidos. Os meios definidos são preparados com água destilada ou deionizada, à qual são adicionados sais constituintes da água do mar e sais nutrientes, a composição do meio é então totalmente controlada, pelo alto custo não é muito utilizado em atividades comerciais, exceto em aplicações que gerem produtos finais de alto valor agregado. Os meios semidefinidos utilizam a água do mar como matriz, a qual é enriquecida com nutrientes inorgânicos e orgânicos, de composição conhecida, como é o caso do meio f/2 utilizado nesse estudo. Já os indefinidos utilizam a água do mar como matriz, que já não é uma solução quimicamente definida, e é enriquecida com uma mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas não determinadas, extratos de solo exemplificam bem esse tipo de meio (LOURENÇO, 2006).

Foi por meio de diversos estudos em laboratório que se pode determinar a importância dos elementos químicos para o crescimento das espécies. Vários conjuntos experimentais de algas cultivadas em meios de cultura com composição química controlada, mudanças sutis nas concentrações dos elementos, uma por vez, com diversas espécies, permitiram que muitos autores fossem definindo a importância relativa de cada elemento para diferentes espécies. Elementos químicos necessários em concentrações da ordem de centenas ou milhares de µg.g⁻¹ de massa seca são tratados como macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si, Fe) elementos necessários em concentrações mais baixas são chamados de micronutrientes (Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se, Ni). Carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco e molibidênio são considerados universalmente necessários para todas as algas, enxofre, potássio e cálcio também são mas podem ser substituídos por outros elementos, sódio, cobalto vanádio, selênio, silício, cloro, boro e iodo são exigidos apenas por algumas algas (LOURENÇO, 2006).

Na década de 1950 Robert R. L. Guillard começou a isolar e cultivar microalgas em seu laboratório e até criou uma coleção de espécies, tendo destaque na

elaboração dos meios de cultura e em parceria com Ryther (Guillard & Ryther, 1962), Guillard criou um meio de cultura amplamente difundido o meio “f” que, posteriormente as concentrações de seus nutrientes foram reduzidas à metade, denominando meio “f/2” (GUILLARD, 1975) e este constitui o meio de cultura amplamente utilizado para o cultivo de microalgas marinhas (Tabela 3).

2.4 CRESCIMENTO MICROALGAL

Em cultivos de microalgas podem ser aplicados determinados parâmetros de crescimento dentre os quais podem ser destacados a densidade celular máxima, a velocidade (taxa) de crescimento e o tempo de cultivo, podem ser determinados por contagem celular direta por microscopia, fluorescência “in vivo” e densidade óptica. De acordo com Lourenço (2006) a densidade celular máxima é o maior valor obtido em números de células por mililitro, já a velocidade de crescimento representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (divisões por dia). O tempo de cultivo é o período transcorrido entre o início do cultivo e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima ou que a biomassa apresentou o maior conteúdo de um determinado composto de interesse para comercialização ou de valor nutricional para alimentação de organismos. A forma dessa curva pode variar de acordo com as condições de cultivo e as espécies cultivadas.

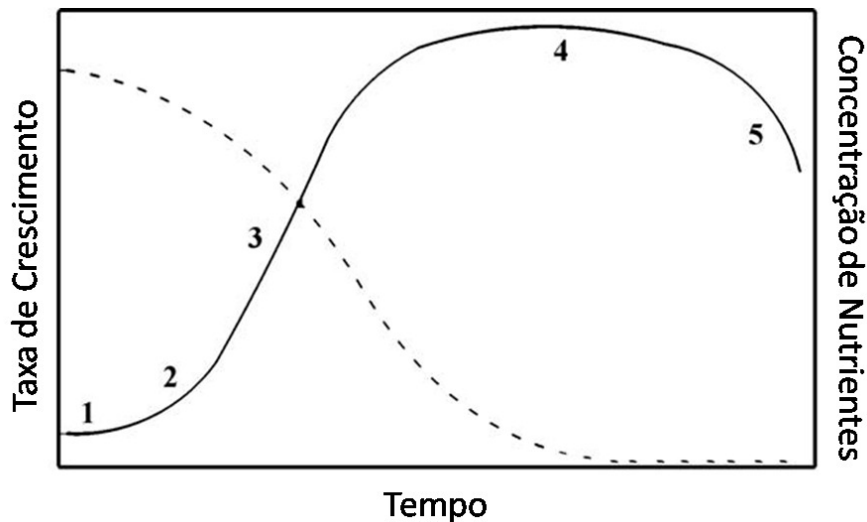


Figura 1. Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada em função de um período de tempo). (1- Fase lag; 2 – Fase log; 3- Fase de redução de crescimento; 4- Fase estacionária; 5-Fase de morte da cultura). FONTE: Mata et al., 2010

- (1) Fase de indução ou lag: período de adaptação onde pode não existir incremento populacional ou até ocorrer redução da densidade celular, a duração deste período é decorrente da composição do meio, tipo, idade e concentração do inoculo;
- (2) Fase de crescimento exponencial ou log: após a fase de adaptação inicia-se a fase de multiplicação celular caracterizada pelo crescimento logarítmico, nessa fase a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos de tempo regulares e a velocidade de crescimento alcança seu ritmo máximo;
- (3) Fase de redução de crescimento – ocorre uma redução na taxa de crescimento, aumentando o tempo de duplicação, a quantidade de nutrientes reduzidos e o autossombreamento diminuem a atividade fotossintética devido a densidade celular;
- (4) Fase estacionária – caracterizada pela constância da densidade celular, podem haver pequenos acréscimos e decréscimos na população, mas ao ajustar a curva (regressão logística) esta fase é representada por uma reta;
- (5) Fase de morte da cultura – acontece devido ao esgotamento dos nutrientes e ao autossombreamento, impossibilitando o crescimento (DERNER, 2006a; DERNER, 2006b).

2.5 LIPÍDIOS

São denominados lipídios ou gorduras diversas substâncias que possuem em comum o fato de não serem solúveis em água. Nesse grupo, podem ser encontradas substâncias como os óleos (ésteres formados a partir de AG – ácidos graxos e que se apresentam sob a forma líquida), gorduras (ésteres formados a partir de AG e que se apresentam sob a forma sólida) e ceras (os principais componentes são ésteres formados a partir de AG e alcoóis de cadeia longa), além de esteróides (como o colesterol e hormônios sexuais), sabões, detergentes e sais biliares. São substâncias bastante abundantes em animais e vegetais, pois desempenham diversas funções nos organismos, como, por exemplo, óleos e gorduras, que são a principal reserva de energia, fosfolipídios e esteróis, que representam cerca da metade da massa das membranas dos seres vivos (CURI et al, 2002).

A estrutura fundamental dos lipídios é composta de AG ou estruturas diretamente a eles relacionadas, como os alcoóis, aldeídos ou aminas. OS AG são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, que podem ser representados pela forma RCO_2H . O grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações. O grupo carboxila constitui a região polar da molécula e a cadeia R, a região apolar (CURI et al, 2002).

A presença de insaturações (duplas ligações) na cadeia hidrocarbônica classifica-os como: saturados, sem duplas ligações e insaturados que possuem uma (monoinsaturados) ou mais de uma (poliinsaturados) insaturações na molécula. Os AG saturados possuem um ponto de fusão maior que os insaturados (CURI et al, 2002).

Os AG insaturados são divididos em quatro classes, conforme a tabela abaixo:

CLASSIFICAÇÃO DOS AG INSATURADOS		
CLASSE	AG PARENTAL	ESTRUTURA
ω -7	Ácido palmitoleico	9-16:1
ω -9	Ácido oleico	9-18:1
ω -6	Ácido linoleico	9,12-18:2
ω -3	Ácido linolênico	9,12,15-18:3

Tabela 2. Classificação dos AG insaturados FONTE: (CURI et al, 2002)

Cada classe é composta por uma família de AG, sendo que todos os membros dessa família podem ser sintetizados a partir de um AG parental, porém o AG de uma determinada classe não pode ser convertido para um de outra classe, isto é, nenhum

membro da família ω -9 (ácido oléico) pode ser convertido em ω -6 (ácido linoléico), por exemplo. Os nomes químicos ou sistemáticos indicam a estrutura química do ácido graxo, começando sempre com a palavra “ácido” e o início do nome sistemático será um prefixo referente aos números de átomos de carbono da maior cadeia hidrocarbonada que contenha a carboxila e o sufixo sempre será *óico* (CURI et al, 2002).

2.5.1 Lipídios microalgas

Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados, quanto mono ou poliinsaturados. Nas microalgas, os ácidos graxos correspondem à maior fração lipídica e os AGPI podem representar de 25 a 60% dos lipídios totais em algumas espécies (BROWN, 1991).

As microalgas sintetizam duas classes principais de lipídios: (a) lipídios neutros que são os mono, di e triacilgliceróis; e (b) lipídios polares que incluem os fosfolipídios e galactolipídios. Esses lipídios são produzidos a partir das fontes de carbono fornecidas à microalga, sejam elas orgânicas como a glicose, acetato ou glicerol, ou inorgânicas como o dióxido de carbono (CO_2) (HUANG et al., 2009). A proporção entre essas duas classes altera-se com a fase do ciclo de crescimento em que o cultivo se encontra: exponencial ou estacionária. Lipídios polares e poliinsaturados são mais abundantes na fase exponencial do cultivo (ALONSO et al., 2000). Segundo o mesmo autor, mudanças do perfil lipídico conforme a idade da cultura se dá pela quantidade de nutrientes e luminosidade do meio. Se há disponibilidade de nutrientes, a tendência é um aumento da densidade celular gerando uma maior competição nutricional e menor disponibilidade de luz. Nessa condição a alga é obrigada a ativar um aparato fotossintético mais complexo e passa a sintetizar mais lipídios polares para a composição das membranas dos cloroplastos.

A biossíntese de triacilglicerídeos nas microalgas compreende três etapas principais: a formação da acetil coenzima A (acetil-CoA) no citoplasma, a elongação e dessaturação das cadeias carbônicas dos ácidos graxos e a formação dos triacilgliceróis, a dessaturação é caracterizada pela introdução de uma dupla ligação na cadeia de carbono e a elongação, pela introdução de dois novos átomos de carbono (HUANG et al., 2009).

Há atualmente interesse na composição dos ácidos graxos e no metabolismo associado das microalgas marinhas para produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs), os ácidos docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) e ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), que nessas combinações são reconhecidos como tendo várias aplicações farmacêuticas (TONON et al., 2002). Informações de ácidos graxos são especialmente importantes em estudos sobre o valor nutricional de microalgas, pois

apresentam várias funções relevantes, dentre elas o fornecimento de energia e a estruturação de membranas biológicas. Há especial interesse em relação à ocorrência de ácidos graxos em microalgas utilizadas na aquicultura. O conteúdo de ácidos graxos é sistematicamente diferente entre os grupos taxonômicos; além disso, são também observadas diferenças, inclusive, entre espécies de mesma classe (BROWN *et al.*, 1997).

Alguns dos fatores que influenciam a variação do conteúdo e a composição do teor de lipídios e ácidos graxos são: luminosidade, temperatura e diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e CO₂. Quando o meio é deficiente em nutrientes como nitrogênio ou fósforo, o que pode ocorrer na fase estacionária do cultivo ou quando é adicionado menos quantidade no meio de cultura, as células exibem um aumento da velocidade de captação do nutriente limitante. À medida que o nutriente vai se esgotando no meio, fica ainda mais difícil para a célula encontrar esse nutriente gerando um stress fisiológico já que a célula já tinha aprimorado seus sistemas de captação para manter sua velocidade de crescimento. Esse estresse altera o metabolismo microalgal direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídios de reserva para preparar a célula para o período de privação (ALONSO *et al.*, 2000; LOURENÇO, 2006). Estudos como de Illman (2000) mostraram que a deficiência de nitrogênio influenciou o teor lipídico da microalga *Chlorella*, aumentando o conteúdo em até 63%. Carvalho & Malcata (2005) estimularam a produção de ácidos graxos poliinsaturados da microalga *Pavlova lutheri* combinando a intensidade luminosa e a concentração de CO₂. Estes são alguns exemplos das possibilidades em aumentar o teor de ácidos graxos controlando as condições de cultivo.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA

A cepa de *S. costatum* foi isolada em fevereiro de 2003 a partir de águas superficiais da praia da Armação do Itapocoroy, município de Penha, no litoral centro-norte de Santa Catarina, Brasil. Desde então é mantida no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Vale do Itajaí em cultivo unialgal em frascos erlenmeyer de 250mL com 150mL de meio de cultura f/2 sob condições controladas (luminosidade de $80 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$).

O meio de cultivo utilizado em todos os tratamentos desse estudo foi o meio semidefinido "f/2" (Guillard, 1975), conforme tabela 3. O meio foi preparado com água do mar, previamente filtrada com auxílio de bomba a vácuo e diluída com água destilada quando necessário o ajuste de salinidade, posteriormente adicionado os nutrientes e autoclavados a 120°C por 30 minutos.

Tabela 3. Modo de preparo do meio f/2 (Guillard, 1975)

Meio f/2			
Quantidade	Composto	Solução Estoque	Concentração molar no meio final
1 mL	NaNO ₃	75 g/L	8.83x 10 ⁻⁴ M
1 mL	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5g/L	3.63x 10 ⁻⁵ M
1 mL	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30g/L	1.07x 10 ⁻⁴ M
1 mL	solução metais traço		
0.5 mL	solução de vitaminas		
Elevar o volume final de 1000 mL com água do mar filtrada e autoclavar			
SOLUÇÃO DE METAIS TRAÇO			
Quantidade	Composto	Solução Estoque	Concentração molar no meio final
3.15 g	FeCl ₃ .6H ₂ O	-	1x10 ⁻⁵ M
4.36 g	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	1x10 ⁻⁵ M
1 mL	CuSO ₄ .5H ₂ O	9.8 g/L	4x10 ⁻⁸ M
1 mL	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6.3 g/L	3x10 ⁻⁸ M
1 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22.0 g/L	8x10 ⁻⁸ M
1 mL	CoCl ₂ .6H ₂ O	10.0 g/L	5x10 ⁻⁸ M
1 mL	MnCl ₂ .4H ₂ O	180.0 g/L	9x10 ⁻⁷ M
Elevar o volume final de 1000 mL com água do mar filtrada e autoclavar			
SOLUÇÃO DE VITAMINAS			
Quantidade	Composto	Solução Estoque	Concentração molar no meio final
1 mL	Vitamina B12 (cyanocobalamina)	1.0 g/L	1x10 ⁻¹⁰ M
10 mL	Biotina	0.1 g/L	2x10 ⁻⁹ M
200 mg	Thiamina. HCl	-	3x10 ⁻⁷ M
Elevar o volume final de 1000 mL com água destilada. Autoclavar e estocar em refrigerador			

3.2 CULTIVOS

Os cultivos foram realizados no laboratório de microbiologia aplicada (LAMA) no CCTMar da UNIVALI. A cultura estoque foi mantida em fase de crescimento exponencial através de repiques a cada cinco dias, feitos sob fluxo de ar estéril em cabine de fluxo laminar. Os inóculos para cada tratamento foram preparados em erlenmeyers de 500ml com 300ml de meio f/2 e 10mL de cultura estoque, sob as mesmas condições que a manutenção da cepa, mantidos em aeração por 3 dias, conforme figura abaixo, para o início de cada cultivo.

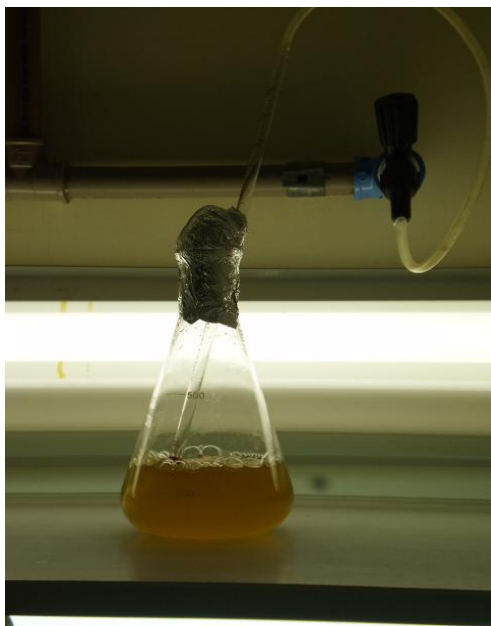


Figura 2. Preparação dos inóculos

A diatomácea *S. costatum* foi cultivada em 3 litros de meio de cultura em erlenmeyers de 3 litros, em triplicatas. Ao todo cinco cultivos foram realizados em totalizando 9 litros (3 réplicas) ao final de cada tratamento. Com temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $80 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro, condições as quais foram empregadas para todos os cultivos. Após o preparo dos meios de cultura estes eram autoclavados e após atingirem a temperatura ambiente eram inoculados com uma densidade celular de aproximadamente 1×10^4 cel/ml.

Os cinco tratamentos foram realizados um por vez no mesmo local da sala de cultivo sob as mesmas condições de luz e temperatura e todos interrompidos com sete dias de cultivo. Os dois primeiros tratamentos (T1 e T2) foram realizados com salinidade 30‰ e 25‰ (partes por mil) respectivamente, a salinidade foi aferida utilizando refratômetro calibrado e para ajuste água destilada, ambos tratamentos foram realizados com a formulação do meio de cultivo f/2 padrão, conforme tabela 3. Os tratamentos (T3 e T4) foram realizados com salinidade de 30‰, porém com diferenças nos volumes colocados na preparação do meio do composto NaNO_3 que no meio f/2 é de 1ml/L, para o tratamento T3 foram colocados 0,75ml/L e no T4 0,50ml/L. O T5 foi realizado com a formulação padrão do meio f/2 e salinidade 30‰ com agitação constante na cultura por injeção de ar atmosférico $0,2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ em cada réplica com auxílio de uma bomba externa comumente utilizada em aquários (figura 4).



Figura 3. Foto demonstrativa da estrutura dos cultivos (tratamento cinco)

3.2.1 Determinações analíticas

3.2.1.1 Densidade celular

A determinação da biomassa foi realizada retirando-se alíquotas a cada 24h a partir da inoculação das culturas, para a análise da densidade celular (n° cel $\times 10^4$ /ml).

3.2.1.2 Clorofila a

A determinação da clorofila *a* foi realizada “*in vivo*”, alíquotas de 5 ml foram coletadas dos cultivos assepticamente na câmara de fluxo, periodicamente e aproximadamente no mesmo horário, inclusive no tempo zero dos experimentos, armazenadas em frascos de vidro e imediatamente levadas para a leitura em fluorímetro calibrado (Fluorometer TD750), com auxílio de cubeta cilíndrica de cristal e logo em seguida adicionado 0,5 ml de formol 4% para posteriormente realizar a contagem celular.

A biomassa em clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) foi obtida pela conversão direta dos dados de fluorescência através da fórmula:

$$\mu\text{g.L}^{-1} = \text{fluorescência} * 2,311$$

3.2.1.3 Contagem celular

Na câmara de contagem Sedwick-rafter, 1 ml foi colocado contando-se um mínimo de 200 células (GUILLARD, 2005) e o número de quadrados os quais estavam distribuídas, sob microscópio óptico ao aumento de 100x. Ao final calculado uma média de células por quadrado da câmara e os valores de densidade celular convertidos por mililitro. Com os valores de densidade de células das três réplicas foram determinados valores médios e calculados os desvios-padrão.

Os resultados das contagens de cada alíquota em cada bioensaio foram plotados como número de células por mililitro (células/ml) em função do tempo em dias, e obtiveram-se as curvas de crescimento da cepa de *Skeletonema costatum* nos diferentes cultivos. A taxa de crescimento foi calculada pela fórmula:

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / t$$

onde:

μ = taxa de crescimento;

N = biomassa final;

N_0 = biomassa inicial;

t = tempo decorrido (dias).

Uma vez plotadas as curvas observou-se o início da fase estacionária onde o cultivo foi interrompido para centrifugação. Os cultivos foram centrifugados em 4000rpm por 10 minutos para a separação da biomassa do meio de cultura, a biomassa úmida foi sendo acumulada durante a centrifugação sendo ao final armazenadas as três réplicas de cada tratamento em falcons de 50 ml e congeladas até serem transferidos para o liofilizador, após esse processo os tubos com a biomassa liofilizada foram mantidos no freezer até as análises dos ácidos graxos.

3.2.2 Extração lipídica e análise do perfil de ácidos graxos

Depois de centrifugadas e liofilizadas as amostras foram analisadas no laboratório de análises químicas na Unidade de Ensaios Químicos e Cromatográficos da EPAGRI na estação experimental de Itajaí/SC onde a determinação dos ácidos graxos foi realizado segundo O'Fallon et al. (2007), com adaptações. Aproximadamente 0,3 g de amostra foram saponificadas diretamente com KOH 0,5 M em metanol a 80 °C por uma hora para posterior esterificação com H₂SO₄ 1,0 M em metanol sob aquecimento de 80 °C por uma hora. Logo após a formação dos ésteres, foi utilizado 2 mL de hexano para recuperar os derivados.

Os ésteres foram então analisados em cromatógrafo gasoso equipado com o detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP2340 (60m x 0,25mm x 0,2µm). As temperaturas do detector e do injetor foram 260°C e 240°C, respectivamente. A programação de aquecimento da coluna foi iniciada com 140°C por 5 minutos e aumento gradual de 4°C por minuto até a temperatura final de 240°C, permanecendo assim por 5min. O fluxo de gás de arraste (H₂) foi de 17mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 0,5µL com razão de split de 1:100. A identificação dos picos, assim como a quantificação, foi feita pela comparação dos tempos de retenção e da área dos picos das amostras com as de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco 37 components FAMES Mix, ref. 47885-U

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

4.1.2 Curvas de Crescimento

Considerando as características de *Skeletonema costatum* ser uma das espécies mais utilizadas em estudos científicos, tanto na maricultura e na ecotoxicologia, quanto por sua relevância ecológica e facilidade com que é encontrada no ambiente natural e com que pode ser mantida em ambiente de laboratório, foi o que levou a aplicação de diferentes tratamentos, sem que ocorresse prejuízo, como a perda da cepa teste, ou o prejuízo fisiológico da microalga. Desta forma, a variação na condição fisiológica seria mínima, porém, o bastante para que provavelmente pudesse modificar vias metabólicas relacionadas somente a produtos de reserva como, por exemplo, os lipídios.

A biomassa de *S. costatum* foi estimada via fluorescência da clorofila-a e através de estimativa da densidade celular durante sete dias. A fluorescência da clorofila-a é diretamente relacionada com a concentração de clorofila-a na amostra, que por sua vez tem relação direta com a biomassa microalgal (PARSONS et al., 1989; LITTLEPAGE, 1998).

Desta forma, os resultados entre as biomassas analisadas não foram diferentes entre os tratamentos com 75%N, 50%N, 30‰ e 25‰, ou seja, não mostraram comportamentos distintos tanto na duração das fases de adaptação, exponencial e fase estacionária. Este comportamento foi observado tanto para densidade celular, quanto para Clorofila-a, mostrando que não ocorreu comprometimento no estado fisiológico da microalga teste. Já para o tratamento com aeração, pode-se observar que ocorreu uma fase de adaptação entre o primeiro e segundo dia de cultivo e no terceiro dia, o crescimento foi de forma exponencial, chegando ao sétimo dia com maior taxa de crescimento que os tratamentos sem aeração, sendo este o melhor tratamento para obtenção de biomassa e rendimento nos compostos analisados.

A fase estacionária é determinada pela constância na taxa de crescimento, ou seja, ocorre o mesmo número de divisão e morte celular neste período. Para todos os tratamentos sem aeração, o início deste processo foi entre o quarto e quinto dia de experimento. Esta fase significa que já está ocorrendo falta dos nutrientes, competição por luminosidade e é um indício que o estagio fisiológico da microalga já está ficando comprometido. Desta forma, quase todas as reservas celulares são convertidas em um composto com menor massa e maior energia, como os lipídios.

Considerando a fisiologia da microalga estudada, Lourenço (2006) relata que, sem injeção de CO₂ no cultivo, o pH da cultura pode subir devido a retirada do mesmo gás pelo metabolismo das microalgas ocasionando uma inibição do crescimento, além da agitação da cultura proporcionar condições de crescimento iguais para todas as células o que estimula o crescimento da população microalgal. Observando as representações gráficas nota-se que, o tratamento com aeração, foi o único cultivo que ainda estava na fase exponencial da cultura.

Entre os cultivos sem aeração a densidade celular máxima alcançada foi no tratamento com 50% de nitrogênio e 30‰ de salinidade tanto no valor de clorofila *a* “*in vivo*” quanto no valor de contagem celular. No tratamento com aeração, 100% de nitrogênio (formulação padrão do meio f/2) e 30‰ de salinidade foi o tratamento com maior densidade celular entre todos. No estudo de Meinerz (2007) com *S. costatum* realizado com o dobro de dias de cultivo, a densidade celular máxima foi atingida no 6º dia com 20°C de temperatura, salinidade 20‰ e razão N:P 16:1 atingindo o valor de $336,23 \times 10^4$ cel/ml. A autora relata agrupamentos estatísticos distintos entre os tratamentos realizados que mostraram maior eficiência no crescimento nos 3 tratamentos com 20°C de temperatura e salinidade 20‰ apesar de serem com concentrações de nitrogênio distintas, no T4 do presente estudo a razão N:P é de 12:1, visto que essa razão na formulação padrão do meio f/2 é de 24:1 e neste tratamento foi colocado apenas 50% do nitrogênio descrito no meio f/2 e o valor máximo de densidade foi de 58×10^4 cel/ml no T4 e 153×10^4 cel/ml no T5 com razão N:P 24:1, o que mostra que, mesmo entre os cultivos sem aeração a concentração de nitrogênio no meio não afetou o crescimento da cepa, sendo que o tratamento com menor concentração desse elemento foi o que obteve maior densidade celular. A microalga *S. costatum* é uma espécie de águas costeiras, sujeitas as variações de nutrientes, considerada eurihalina, que suporta variações de salinidade, alguns autores encontraram seu crescimento ótimo com 20‰ de salinidade (MEINERZ, 2007; RENAUD, 1999), enquanto outros encontraram bons resultados com 30‰ (TONON, 2002), isso se deve pela influência de outros fatores ou por diferenças nas cepas cultivadas em laboratório. Este comportamento também foi observado no presente estudo, visto a plasticidade e tolerância a diferentes condições de cultivo sem alteração no seu perfil de crescimento e biomassa.

A maior taxa de crescimento foi observada no T5, até 0,80 div/dia as menores taxas foram observadas nos tratamentos T1 e T2 até $0,66 \pm 0,01$ div/dia e os tratamentos com variação de nitrogênio ficou em média $0,72 \pm 0,02$ div/dia, todos esses valores médios correspondem à fase exponencial dos cultivos, onde as taxas de divisão celulares são

maiores.

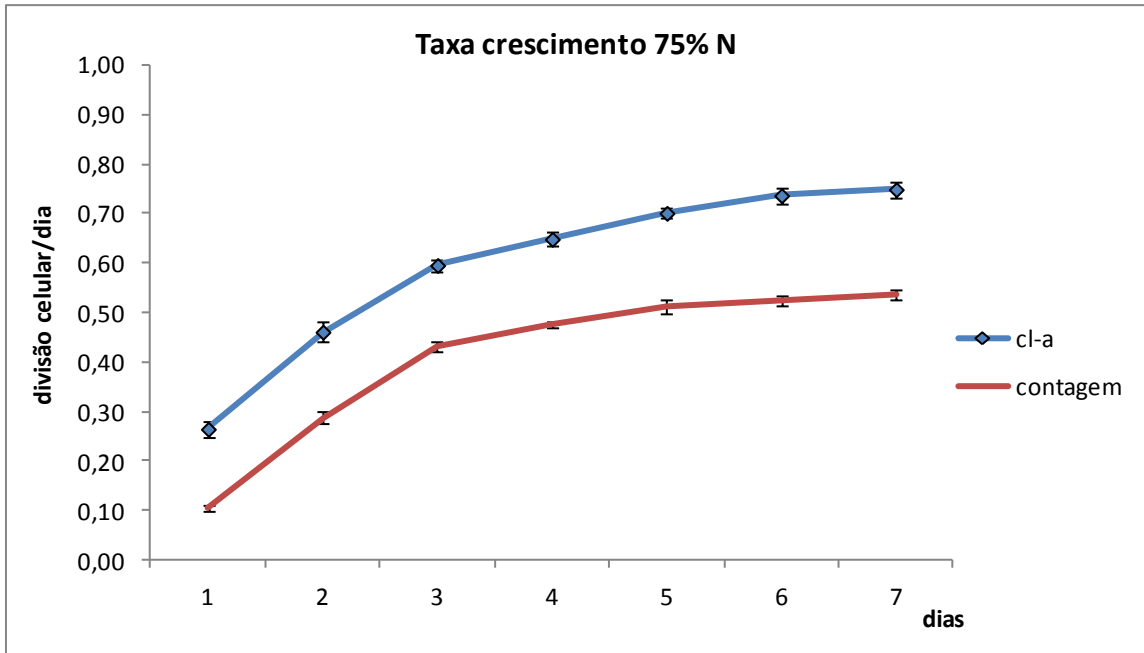


Figura 4. Taxa de crescimento celular a partir dos dados de clorofila *a* e densidade de células do tratamento com 75% da concentração de nitrogênio (Nitrato) em relação ao controle e salinidade 30.

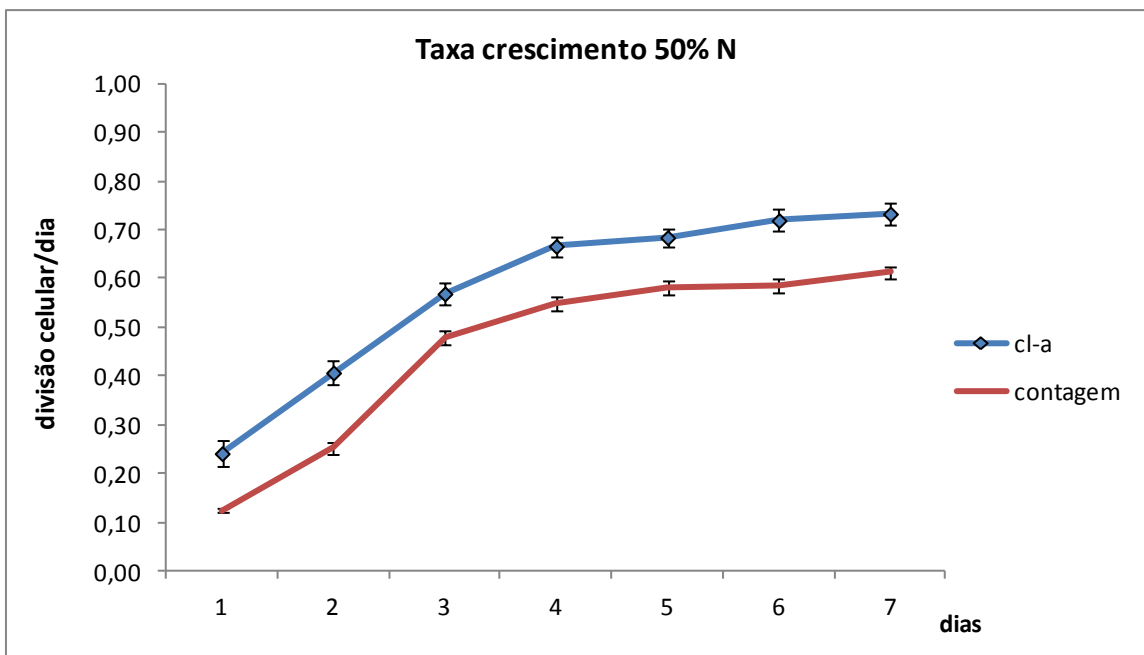


Figura 5. Taxa de crescimento celular a partir dos dados de clorofila *a* e densidade de células do tratamento com 50% da concentração de nitrogênio (Nitrato) em relação ao controle e salinidade 30.

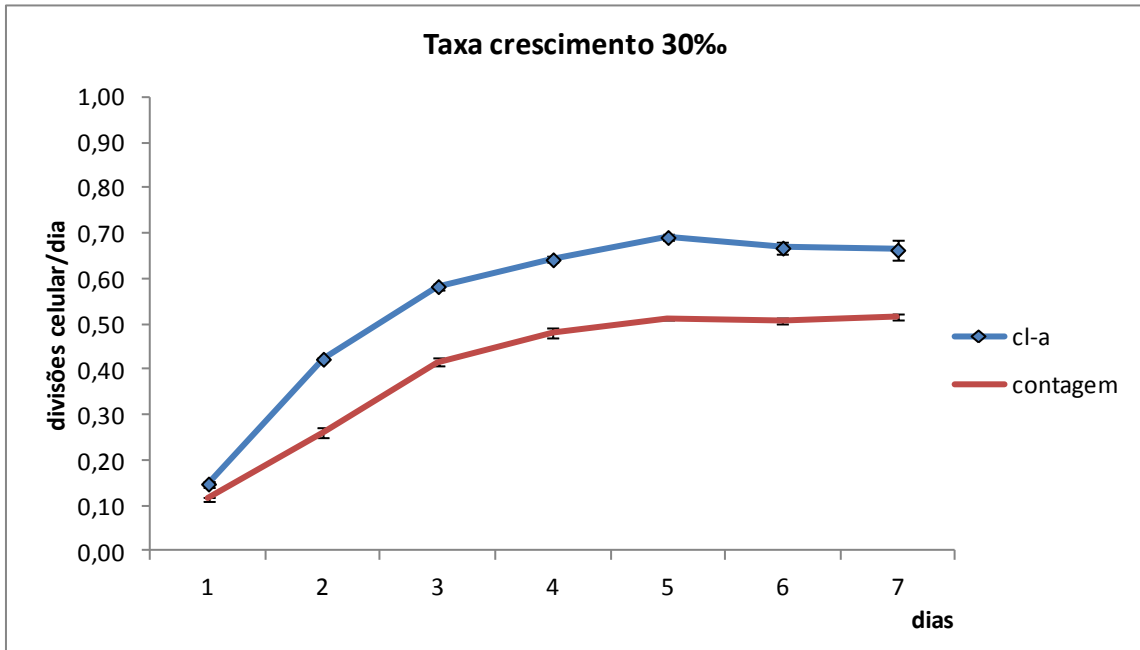


Figura 6. Taxa de crescimento celular a partir dos dados de clorofila a e densidade de células do tratamento com salinidade 30, com concentração de nitrogênio padrão.

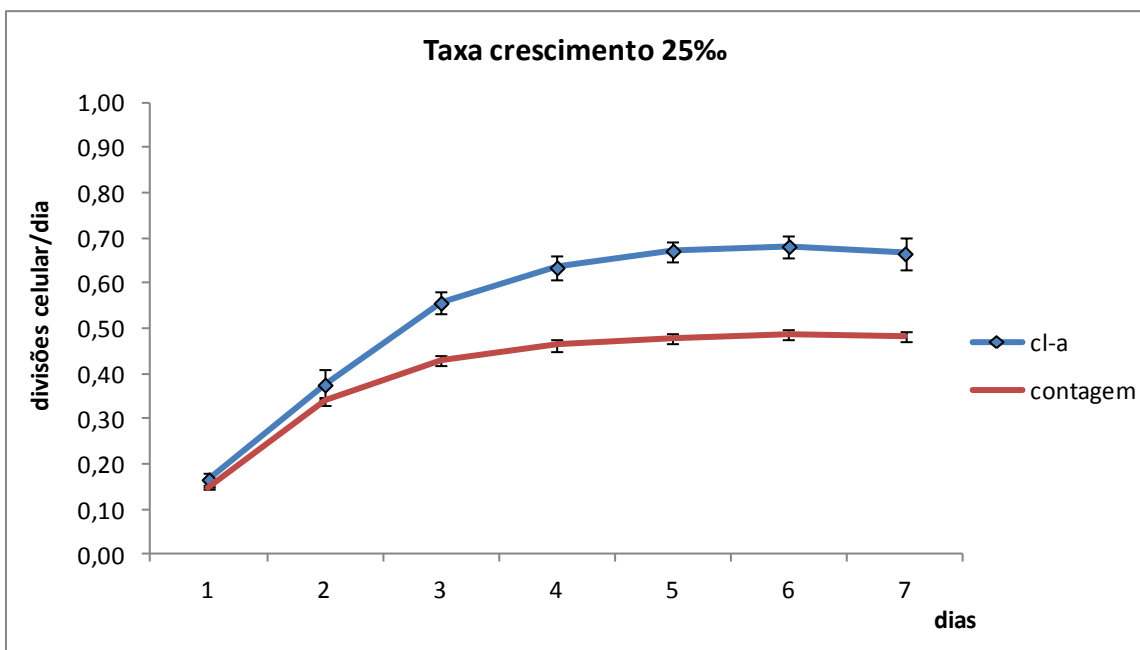


Figura 7. Taxa de crescimento celular a partir dos dados de clorofila a e densidade de células do tratamento com salinidade 25, com concentração de nitrogênio padrão.

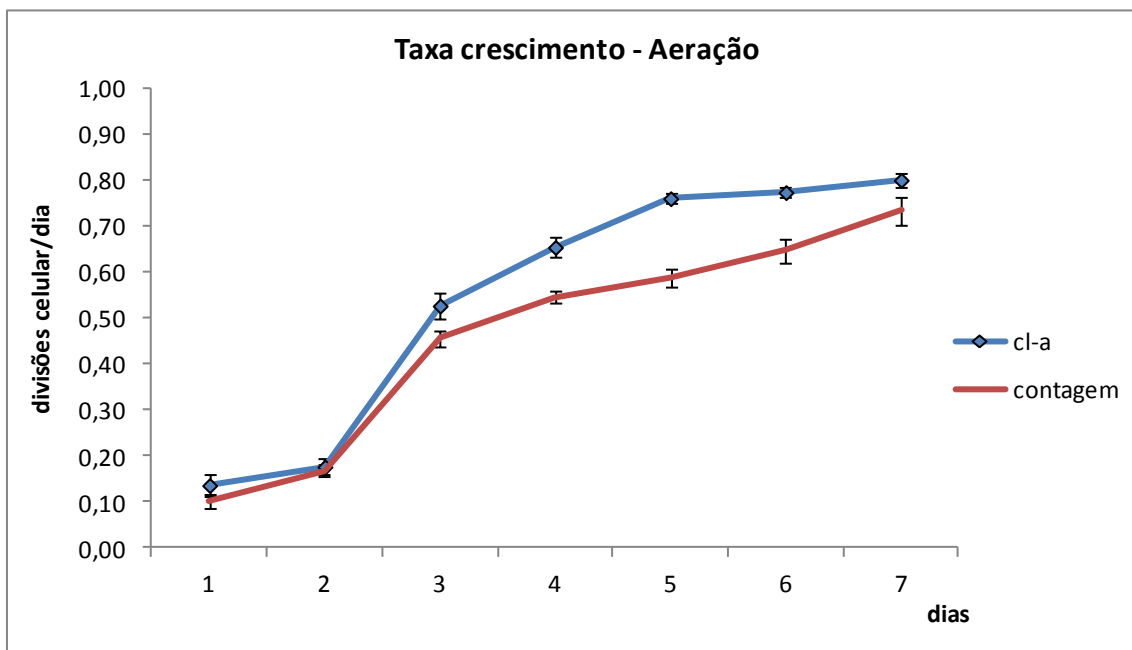


Figura 8. Taxa de crescimento celular a partir dos dados de clorofila a e densidade de células do tratamento com salinidade 30 concentração de nitrogênio (nitrato) padrão do meio f/2 e aeração.

4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS

4.2.1 Perfil dos ácidos graxos

Os dados quantitativos dos ácidos graxos identificados em cada tratamento estão apresentados em porcentagem do valor total de ácidos graxos identificados e mesmo os que não foram possíveis de identificar no cromatograma, tiveram seus valores somados para uma melhor quantificação dos AG identificados. O teor lipídico total na biomassa não foi analisado nesse trabalho. As análises cromatográficas dos tratamentos T1, T2, T3 e T4, todos sem aeração no cultivo, não se mostraram satisfatórias (Anexos 1 ao 12) devido, provavelmente, à baixa biomassa produzida, porém apesar das poucas condições apresentadas para poder afirmar a diferença do perfil de AG entre os tratamentos, nota-se que, as amostras tiveram um padrão dos AG que foram possíveis de identificar, partindo desse pressuposto que este seja o perfil dos principais AG sintetizados por essa cepa da diatomácea *S. costatum*, este perfil é discutido quanto à aplicabilidade de cada AG e semelhança com outros trabalhos com a mesma espécie.

Entre os dois ácidos graxos saturados identificados na cepa de *S. costatum* desse estudo o mirístico teve uma porcentagem mais significativa que o palmítico e apresentou maiores valores nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, sendo em média $46,5 \pm 2,41\%$

dos ácidos graxos totais e 16,9% no T5. O AG palmítico em todos os tratamentos apresentou valor médio de $10,2\pm 0,96\%$. Dos dois AG monoinsaturados identificados o palmitoleico apresentou maior percentagem nos cultivos T3, T4 e T5 em média $21,7\pm 0,86\%$ e o oleico foi menos representativo apresentando uma média de $4,8\pm 1,04\%$ nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 e apenas 2,5% no T5. Dos AG poliinsaturado, o EPA teve valores irrisórios em T1, T2, T3 e T4, $5,8\pm 0,45\%$ quando comparados com T5 que apresentou 23%, já o DHA apresentou valores baixos em todos os tratamentos, conforme tabela 4.

Apesar dos dados gerados através da análise de cromatografia gasosa apresentarem valores preliminares com baixa consistência devido a baixa biomassa os perfis de ácido graxo da diatomácea *Skeletonema costatum* nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, estes apresentaram, qualitativamente, o mesmo perfil de ácidos graxos identificados que o T5. Porém os valores quantitativos não podem ser afirmados como sendo por causa das diferenças entre concentração de nitrogênio e salinidade, pois as análises químicas não foram satisfatórias.

O perfil de ácidos graxos neste trabalho concorda com os resultados de Berge (1995), Renaud (1999), Zhukova (1994) e Brown (1997), em todos esses trabalhos a abundância relativa de ácidos graxos variaram, porém em todos os ácidos mais representativos foram o palmítico, palmitoleico e o EPA. Em condições de cultivo semelhantes (temperatura, fotoperíodo e tempo de cultivo), mas utilizando o meio de cultura Conway e salinidade 33 psu em todos os cultivos, Campos et al., (2010) encontrou nessa espécie esses mesmos ácidos graxos entre outros mas com valores diferentes, o que mais chama a atenção é a percentagem de EPA identificada por esse autor muito baixa, sendo apresentado apenas 1,7% dos ácidos graxos totais. Como já citado anteriormente o conteúdo bioquímico, incluindo o perfil de ácidos graxos, podem variar dentro da mesma espécie pelas diferenças de condições de cultivo e fases de crescimento. Para a produção de EPA o presente estudo mostrou ser satisfatório com a formulação padrão do meio f/2 e salinidade 30‰ em fase exponencial do cultivo.

Tonon (2002) analisando AG produzidos por quatro microalgas entre estas duas diatomáceas encontrou diferenças nas percentagens entre a fase exponencial e estacionária dos AG produzidos, as microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira pseudonana* apresentaram perfil de AG identificados semelhantes a este estudo sendo mais representativos os AG: mirístico, palmítico, palmitoleico, oléico e EPA, o AGPI DHA não foi detectado em nenhuma destas microalgas e o valor de EPA foi de $29,98\pm 0,10\%$ na fase exponencial e de $11,57\pm 0,58\%$ na estacionária para *Phaeodactylum tricornutum* e $16,66\pm 0,20\%$ na fase exponencial e $12,29\pm 0,17\%$ na estacionária para *Thalassiosira*

pseudonana concordando que os maiores valores obtidos foram fase exponencial T5 do presente trabalho.

Tratamento	T1 30 %	T2 25 %	T3 75%	T4 50%	aeração
Ácido graxo	%	%	%	%	%
Mirístico C14:0	49,7	47,0	44,2	45,1	16,9
Palmitico C16:0	10,2	10,2	10,6	11,2	8,7
Palmitoleico C16:1	15,4	16,0	20,9	21,6	22,6
*	7,2	8,5	8,0	6,9	7,6
*	4,1	5,9	4,8	4,3	15,2
Oleico C18:1	6,3	4,5	4,1	4,2	2,5
EPA C20:5	5,2	6,3	5,8	5,6	23,0
DHA C22:6	1,9	2,3	1,8	1,7	3,7

Tabela 4. Médias das porcentagens dos principais AG identificados. * não identificado

O ácido graxo palmítico é um dos ácidos graxos saturados mais comumente encontrado em animais e plantas, a origem do nome comum palmítico se deu por ser este o AGS de maior quantidade no óleo de palma. O ácido graxo mirístico possui esse nome, pois é encontrado em abundância na moscadeira (*Myristica fragrans*) (CURI et al., 2002). Segundo Chisti (2007), AGS e AGM entre 14 e 18 carbonos são potenciais fontes de matéria prima para produção de biodiesel, o ácido palmítico e mirístico se enquadram nessas condições, porém seria necessário mais estudos com a microalga *S. costatum* para poder afirmar as condições de cultivo que otimize a produção desses ácidos graxos.

O ácido palmitoléico (C16:1) apresentou-se em maior concentração em relação aos outros ácidos graxos monoinsaturados (AGM), esse AG é responsável pelo metabolismo dos lipídios, podendo ajudar no equilíbrio dos níveis de colesterol HDL e LDL, reduzir a taxa de açúcar no sangue e favorecer a queda de gordura dos tecidos que envolvem o fígado e o coração, o que faz com que tenha uma aplicabilidade terapêutica na dieta humana e seja considerado um ácido graxo nobre (WEN & CHEN, 2000). No estudo de Costa (2006) para a microalga *Chlorella vulgaris* o ácido palmítico chegou a apresentar 69% de abundância.

Dentre os ácidos graxos poliinsaturados, o EPA foi encontrado em relevante proporção nesse estudo no cultivo com aeração, Os ácidos EPA e DHA também são

considerados ácidos graxos nobres e são essenciais na dieta. Podem atuar na prevenção e tratamento de várias doenças, como cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (SANDER, 2000).

Na aqüicultura, os ácidos EPA e DHA têm sido estudados quanto à qualidade nutricional dos alimentos oferecidos para reprodutores, principalmente de moluscos bivalves. Existe um efeito do estado nutricional dos reprodutores e a qualidade das larvas por estes produzidas. Os ácidos graxos DHA e EPA são importantes no crescimento e na sobrevivência de moluscos (TRIDER & CASTELL, 1980). O ácido graxo EPA nos moluscos está relacionada à reserva de energia durante a embriogênese. Robinson (1992) cita que ácido graxo EPA, em moluscos bivalves, afeta a qualidade da desova e que este ácido graxo é o mais abundante durante a metamorfose, já o DHA tem função estrutural, além de energia. A relação entre os ácidos graxos EPA e DHA (DHA: EPA aproximadamente 1:2 respectivamente) é mais importante que os níveis absolutos dos dois ácidos graxos segundo Leonardos; Lucas (1999). Sendo assim, com os níveis de abundância de EPA encontrado nesse estudo, seria necessária uma suplementação do ácido DHA para uma melhor qualidade nutricional desses organismos. Renaud (1999) e Brown (1997), analisaram outros compostos além dos ácidos graxos nessa espécie, confirmando seu potencial como fonte nutricional para organismos cultiváveis.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Independente dos tratamentos com diferentes concentrações de nutrientes, salinidade, o perfil de AG foi similar, demonstrando que a diatomácea *S. costatum*, a princípio não é afetada por estresse programado, com mudanças na sua composição metabólica, porém é necessário mais estudos para avaliar as diferenças quantitativas desses ácidos graxos;

O efeito físico de aeração foi expressivo no aumento da taxa de crescimento e consequentemente na geração de biomassa aumentando a eficácia na identificação e rendimento dos AG;

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que não é compensatório cultivar a microalga *skeletonema costatum* sem a interferência de processos físicos como aeração na cultura com relação à biomassa produzida;

A microalga *Skeletonema costatum* possui potencial de produção de ácidos graxos nobres como o AG palmítico e EPA, considerados ácidos graxos essenciais que possuem aplicações terapêuticas na dieta humana;

6 REFERÊNCIAS

- ALONSO, D. L. et al. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Photochemistry**, n°54, p 461 – 471, 2000.
- ALLEN, E. J. & NELSON, E. W. On the artificial culture of marine plankton organisms **Journal marine Biology Assoc. U.K.**, 8: 421-474. In: **Composição da água do mar, nutrição algácea e meios de cultura**. Cap.4 p. 169-220. In: LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 606 p. 2006.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 293 p. 1995.
- BENEMAN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Journal of Industrial Microbiology**, v.31, n.5,p.247-256,1990
- BERGE, J. P. GOUYGOU J. P. DUBACQ J. P. DURAND P. Reassessment of lipid composition of the diatom *Skeletonema costatum* **Phytochemistry**, 39 (5), pp. 1017 – 1021. 1995.
- BONECKER, A. C. T.; BONECKER, S. L. C.; BASSANI, C. O Plâncton marinho. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES,A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Interciência: Rio de Janeiro. p.103-125. 2002.
- BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K. e DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**. v. 151 p.315-331, 1997.
- BROWN, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.145, p. 79-99, 1991.
- BROWN, M. L. & ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Convers Manage**. 34, 1005 – 1013, 1993.
- CAMPOS, Viviane Borges; BARBARINO, Elisabete; LOURENÇO, Sérgio de Oliveira. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, n. 40, p.339-347, 2010.
- CARVALHO, A. P.; MALCATA, F. X. Optimization of w-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. **Marine Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 381-388, 2005.
- CÉRON GARCÍA, M.C. et al. Mixotrophic growth of the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297-305, 2005.
- COSTA, J. A. V. et al. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.17, n.4, 2006.
- CURI,R.; POMPÉIA C.; MIYASAKA C. K.; PROCOPIO J. **Entendendo a Gordura: Os ácidos graxos**. Barueri/SP: Manole. 579 p. 2002.
- CHIU, S.Y.; KAO, C.Y.; TSAI , M.T.; ONG, S.C.; CHEN , C.H.; LIN, C-S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresour Technol** 100: 833-838. 2009.

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

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 140 f. 2006 (a)

DERNER, R. B. ; OHSE, S. ; VILLELA, M. ; CARVALHO, S. M. de ; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959 – 1967, Nov./Dez. 2006 (b)

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in México. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. **Algae biomass**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. p.51-64.

GUILLARD, Robert R. L.; SIERACKI, Michael S.. Counting Cells in Cultures with the Light Microscope. In: ANDERSEN, Robert A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 250-264.

GOMES, Luiz Antônio de Oliveira. **Cultivo de Crustáceos e Moluscos**. São Paulo: Nobel, 1986, 198p.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2011. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acessado em: 09 de agosto de 2011.

HASLE, G. R. & SYVERTSEN, E. E. Marine Diatoms. In: Tomas, C. R. (ed.) **Identifying Marine Phytoplankton**. Academic Press, Inc. San Diego, Califórnia p. 44 e 45. 1996.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 06. 2009.

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

LEONARDOS, Nikos; LUCAS, Ian A. The use of larval fatty acids as an index of growth in *Mytilus edulis* L. larvae. **Aquaculture**, N. Wales, Uk, n. 184, p.155-166, 2000.

LITTLEPAGE, J. L. 1998. **A laboratory and shipboard manual of oceanographic techniques: chemical and biological oceanography**. Department of Biology, University of Victoria, 230p.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

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

MARINS. M. O. S. **A utilização da microalga *Skeletonema costatum* (Geville) Cleve (Bacillariophyceae) na avaliação da qualidade ambiental de áreas estuarinas de Pernambuco**. Recife, 2007, 142f. Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais) - Universidade Federal de Pernambuco.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n.1, p. 217–232, 2010.

MEINERZ, Lisandra Isabel. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira.** 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007

MOROZOVA, T. V.; ORLOVA, T. Y. Monitoring of Phytoplankton in the Area of sea farm in Vostok bay (Sea of Japan). **Journal of plankton research.** V. 25, n. 10, p 1227-1235, 2005. In: MARINS. M. O. S. **A utilização da microalga *Skeletonema costatum* (Geville) Cleve (Bacillariophyceae) na avaliação da qualidade ambiental de áreas estuarinas de Pernambuco.** Recife, 2007, 142f. Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais) - Universidade Federal de Pernambuco.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, n°34, p. 1 – 5, 2008.

NORTON, T. A.; ANDERSEN, R. A.; MELKONIAN, M. Algal biodiversity. **Phycology**, v.35, p.308-326, 1996.

O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1511-1521, 2007

OHSE, Silvana et al. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, 2009 v. 39, n.

PARSONS, T. R.; MAITA, Y. E LALLI, C. M. 1989. **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis.** Pergamon Press. 173 p

PENTEADO, Daiane Maria Rogenski. **Estudos de Otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para produção de lipídios.** 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Departamento de Biquímica, UFPR, Curitiba, 2010.

PEREZ, H. E. B. Biodiesel de Microalgas, parte 1, 2007. Disponível em <http://www.energiaverde.com.br> Acessado em: 10 fev 2011.

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

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal* 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996, 728 p.

RENAUD, S.M.; L-V. Thinh, G. Lambrinidis and D.L. Parry, Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, n. 211 1999, p. 195–214.

REVIERS, Bruno de. **Biologia e Filogenia das Algas.** Porto Alegre: Artmed, 2006. 280 p. Tradução lara Maria Franceschini.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** Oxford: Black Well Science, 2004. 566p.

ROUND, F.E. & CRAWFORD, R.M. 1990. Phylum Bacillariophyta. In: **Handbook of Protoctista** (Margulis, L.; Corliss, J.O.; Melkonian, M. & Chapman, D. J. eds.). Jones and Bartlett, Boston, 574-596 p.

SANDER, A.B.T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 176-178,2000.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, M.E. **Microalga como materia-prima para a producao de biodiesel**. Instituto Nacional de Tecnologia. Programa: Biodiesel, o novo combustivel do Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2006.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.3-19.

TONON, T.; HARVEY, D.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. **Phytochemistry**. v. 61, p. 15–24. 2002

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L..**Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A.. Fatty acid composition of 15 species of Marine Microalgae. **Phytochemistry**, Vladivostok, Russia, n.39, p.351-356, 1994.

ANEXOS
