

Milena Camargo Honorato

**CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS E
PROSPECÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
BIOMOLÉCULAS NA DIATOMÁCEA *Asterionellopsis glacialis*
(CASTRACANE) ROUND**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig

**Florianópolis
2014**

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

HONORATO, MILENA CAMARGO

CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO DE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E BIOMOLÉCULAS NA DIATOMÁCEA
Asterionellopsis glacialis (CASTRACANE) ROUND / MILENA
CAMARGO HONORATO ; orientador, LEONARDO RUBI RÖRIG -
Florianópolis, SC, 2014.

105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.
ASTERIONELLOPSIS GLACIALIS. 3. ECOFISIOLOGIA. 4.
ALELOPATIA. 5. ÁCIDOS GRAXOS. I. RÖRIG, LEONARDO RUBI. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. III.
Título.

Milena Camargo Honorato

**CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO DE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E BIOMOLÉCULAS NA
DIATOMÁCEA *Asterionellopsis glacialis* (CASTRACANE)
ROUND**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Florianópolis, 22 de agosto de 2014.

Banca:

Maria Alice Neves, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Leonardo Rubi Rörig Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Francisco Carlos Deschamps, Dr.
Empresa de Pesquisa e Agropecuária e Extensão Rural de Santa
Catarina (EPAGRI)

Roberto Bianchini Derner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Paulo Antunes Horta, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais Vicente Honorato Sobrinho e Maria Filomena Camargo Honorato, a minha irmã Marcela Camargo Honorato. E aos meus colegas de laboratório.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me encaminhar e guiar pelos caminhos da vida até este momento.

Agradeço ao meu orientador Leonardo Rubi Rörig, por ter me passado ensinamentos não somente profissionais, mas lições que levarei para a vida.

Agradeço aos meus pais Vicente Honorato Sobrinho e Maria Filomena Camargo Honorato, por terem me ensinado que a única coisa que ninguém pode tirar de nós é o estudo. Por terem se esforçado tanto para que hoje eu pudesse ter esse momento realizado, pelas horas de conversas sobre o futuro, sobre os planos traçados, pelos dias que me ajudaram a enfrentar as saudades, por toda força, compreensão e auxílio que sempre me deram.

Agradeço a minha irmã Marcela Camargo Honorato, que me aconselhou e aconselha sempre que necessário, quando tenho dúvidas e incertezas.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Maevi Ottoneli, Leandro Ambrósio dos Reis, Pablo Gresser, Maria Cecília Miotto, João Vitor Heberle Lins e Ana Gabriela Itokazu, sem vocês este trabalho não teria se concretizado.

Agradeço a Manoela Pires da Rosa, por ter me ajudado a manter a calma nos momentos necessários e por me alertar à realidade quando meu foco desencaminhava.

Agradeço à CAPES por me fornecer a bolsa de mestrado.

Agradeço ao CNPQ por ter financiado indiretamente este trabalho.

Agradeço a Marcelo Maraschin, Maria Tereza Rojo, Francisco Deschamps, César Augusto Stramosk, por todo o ensinamento que me passaram, pelas análises realizadas, por dedicarem parte de seu tempo para poder contribuir à realização deste trabalho.

Agradeço à EPAGRI, pelo espaço concedido à realização das análises bioquímicas.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

Manchas decorrentes da acumulação de diatomáceas na zona de arrebentação são comuns em praias arenosas de características dissipativas. O seu aparecimento está correlacionado com fatores ambientais como a passagem de frentes frias quando ventos promovem o aumento da hidrodinâmica praial, ressuspensando estoques bênticos dessas diatomáceas e acumulando-as próximo à praia. A Praia do Rincão, localizada no município de Içara - SC, e a Praia de Navegantes - SC apresentam acumulações de *Asterionellopsis glacialis*. A biomassa elevada dessa alga e sua importância central na estrutura trófica marinha chamam a atenção para o estudo dos potenciais da referida alga para fins aplicados. No presente estudo, cepas de *A. glacialis* foram isoladas, cultivadas e avaliadas quanto a aspectos ecofisiológicos como o comportamento morfológico, alelopatia e taxas de crescimento em diferentes condições; além de potenciais biotecnológicos como a atividade biológica de exsudatos e o teor e perfil de ácidos graxos. As células de *A. glacialis* em cultivo mostraram deformações, as quais foram amenizadas pelo uso de meios de cultura mais ricos em silício e fósforo. Os exsudatos das cepas não apresentaram efeitos alelopáticos. Os teores de lipídeos foram diferentes entre as cepas e entre meios de cultura. Os valores variaram de 9% a 13,6% em massa seca. Em todas as cepas foram identificados ácidos graxos saturados e ácidos graxos poli-insaturados (ácido eicosapentanoico - EPA e ácidos docosahexaenoico - DHA, este último em uma das cepas). Algumas hipóteses são levantadas para tentar explicar a considerável variação nos teores de lipídeos e no perfil de ácidos graxos entre cepas de uma mesma espécie, sugerindo possibilidade de direcionamento dos cultivos para condições desejadas em termos de teor de lipídeos e perfil de ácidos graxos.

Palavras chave: Zona de arrebentação, *Asterionellopsis glacialis*, ácidos graxos.

ABSTRACT

Spots arising from the accumulation of diatoms in the surf zone are common on sandy beaches dissipative characteristics. Its appearance is correlated with environmental factors such as the passage of cold fronts when winds promote increased praiial hydrodynamics, resuspending benthic diatoms and accumulating these stocks them near the beach. The Beach Rincão localized in Içara - SC, and the beach Navegantes - SC, have accumulations of *Asterionellopsis glacialis*. The high biomass of this alga and its central importance in the trophic structure of marine draw attention to the study of the potential applied to the same purposes. In the present study, strains of *A. glacialis* were isolated, cultured and evaluated for ecophysiological aspects such as the morphological behavior, allelopathy and growth rates under different conditions; and potential biotechnological and biological activity of exudates and the content and fatty acid profile. *A. glacialis* cells in culture showed deformation, which were ameliorated by the use of culture media rich in silicon and phosphorus. Exudates of the strains showed no allelopathic effects. The levels of lipids were different between strains and between culture medium. Values ranged from 9% to 13.6% by dry weight. In all strains saturated fatty acids and polyunsaturated (- EPA and docosahexaenoic acid - DHA, the latter in one of the strains eicosapentaenoic acid) fatty acids were identified. Some hypotheses were proposed to try to explain the considerable variation in the levels of lipids and fatty acid profiles among strains of the same species, suggesting the possibility of targeting the desired conditions for crops in terms of lipid content and fatty acid profile.

Keywords: the surf zone, *Asterionellopsis glacialis*, fatty acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Detalhe de cadeias de células de <i>Asterionellopsis glacialis</i>	30
Figura 2. Sequência de procedimentos executados desde a coleta até os processamentos. Obs.: os procedimentos em cor azul foram executados com ambas as cepas (Rincão e Navegantes); os procedimentos em cor vermelha foram realizados apenas com a cepa Rincão.....	51
Figura 3. Acumulações da diatomácea <i>Asterionellopsis glacialis</i> na zona de arrebenção e sobre a areia na praia do Rincão, município de Balneário Rincão - SC.....	54
Figura 4. Fotomicrografias ópticas em campo claro de <i>Asterionellopsis glacialis</i> . (A) células em cadeia espiralada, coletadas em campo. Escala: 20µm; (B) célula individual de ambiente natural, escala: 8 µm; (C) células em cadeia em meio de cultura F/2, escala: 20 µm; (D) células em grumos em meio de cultura F/2, escala: 20 µm; (E) possível auxósporo em meio de cultura F/2, escala: 20 µm; (F, G e H) células em cadeia em meio de cultura IMR, escala: 20 µm.....	62
Figura 5. Gráficos da densidade celular de <i>Asterionellopsis glacialis</i> (cél.mL ⁻¹) comparativa entre meios de cultura F/2 e IMR. (azul) densidade celular em meio de cultura IMR em sistema estático e aerado (vermelho); (b)densidade celular em meio de cultura F/2 em sistema estático (verde) e aerado (roxo). Barras de erro padrão calculado através do desvio padrão das médias das réplicas.....	63
Figura 6. Gráfico da densidade celular (cél.mL ⁻¹) de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> sob a influência do exsudato de <i>Asterionellopsis glacialis</i> em diferentes concentrações durante 96 horas. (azul) 0% de exsudato; (vermelho) 10% de exsudato; (verde) 25% de exsudato; (roxo) 50% de exsudato; (azul claro) 100% de exsudato. Barras de erro calculadas através do desvio padrão das médias das réplicas...	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ácidos graxos saturados e poli-insaturados de diferentes espécies de microalgas da classe Bacillariophyceae.	35
Tabela 2. Ácidos graxos saturados e poli-insaturados de diferentes espécies de microalgas.....	36
Tabela 3. Efeitos no perfil de lipídeos diante alterações nas condições de cultivo.	40
Tabela 4. Características dos locais onde foram coletadas as amostras das quais foram isoladas as cepas de <i>Asterionellopsis glacialis</i> utilizadas nesse trabalho.	48
Tabela 5. Características dos testes lumistox realizados com os exsudatos de cultivos e do ambiente natural (floração de <i>Asterionellopsis glacialis</i>).....	55
Tabela 6. Características do teste de inibição do crescimento microalgal, teste realizado em triplicata (A, B, C).....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
3. OBJETIVOS	46
3.1. OBJETIVO GERAL	46
4. METODOLOGIA	48
4.1. Amostragens	53
4.2. Metodologia da análise morfológica	54
4.3. Teste inibição da bioluminescência da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> – lumistox	54
4.4. Teste inibição de crescimento microalgal – <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	55
4.5. Taxa de crescimento dos cultivos	56
4.6. Quantificação do fitoplâncton	57
4.7. Teste inibição ao crescimento microbiano	58
4.8. Lípidos	59
5. RESULTADOS	61
5.1. Morfologia celular de <i>asterionellopsis glacialis</i> no ambiente natural e em cultivo	61
5.2. Parâmetros ecofisiológicos das cepas de <i>Asterionellopsis glacialis</i> .	62

5.3.	Inibição da bioluminescência bacteriana	64
5.4.	Teste inibição de crescimento microbiano (Bactérias gram positivas, gram negativas e fungos) e microalgal (<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>)	65
6.	DISCUSSÃO	69
6.1.	Morfologia celular de <i>Asterionellopsis glacialis</i> no ambiente natural e em cultivo	69
6.2.	Parâmetros ecofisiológicos das cepas de <i>Asterionellopsis glacialis</i>	71
6.3.	Inibição do crescimento de micro-organismos (bactérias, fungos e diatomácea <i>Phaeodactylum tricornerutum</i>)	73
6.4.	Lipídeos	76
7.	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A - MEIO DE CULTURA F/2 (GUILLARD, 1975)	103
	Anexo B - meio de cultura IMR (EPPLEY et al., 1967)	105

1. INTRODUÇÃO

As algas são organismos onipresentes e evoluíram como produtores primários de biomassa por bilhões de anos representando, portanto, uma gama diversa de fisiologias e biomoléculas (PANDEY *et al.*, 2014). Estima-se que 50.000 espécies tenham sido descritas, mas acredita-se que o número real de espécies existentes seja significativamente superior (MATA *et al.*, 2010). Essa assembleia extremamente diversificada, predominantemente autotrófica, é um recurso excepcionalmente rico para a bioprospecção (SCHIMITZ *et al.*, 2012).

As microalgas planctônicas (fitoplâncton) são responsáveis por mais de 90% da biomassa marinha, sendo consideradas base da cadeia trófica por fornecerem matéria orgânica e oxigênio para vários organismos (HALLEGRAEFF, 2003). A produção primária do fitoplâncton marinho representa cerca de 50% do total de produção primária do planeta (FIELD *et al.*, 1998). São fontes de macronutrientes, vitaminas e elementos traços que influenciam o valor nutricional de herbívoros aquáticos, pois são ricas fontes de proteínas, carboidratos e especialmente ácidos graxos (ROCHA *et al.*, 2003; VALENZUELA-ESPINOZA *et al.*, 2002). As diatomáceas pertencem ao filo *Heterokontophyta* – Classe *Bacillariophyceae* e estão entre as mais abundantes e produtivas algas dos mares e águas doces. Apresentam como principais características a presença de parede celular impregnada de sílica (frústula), clorofilas *a* e *c*, além de fucoxantina, diadinoxantina e diatoxantina como pigmentos, sendo a crisolaminarina (glicano β 1-3 ramificado em β 1-6) e ácidos graxos os produtos de reserva (LEE, 2008).

Segundo COX *et al.* (2011), entre as principais características das diatomáceas destaca-se a presença de cingulo e frústula. O conteúdo das células é semelhante a outras algas eucariontes, incluindo o núcleo, cloroplastos e mitocôndria. Entretanto a frústula, que é constituída por duas partes chamadas de valvas (superior, denominada epiteca, e a inferior, hipoteca), é impregnada de sílica, que fornece rigidez à parede das células, determina aspectos da reprodução e auxilia a preservação das frústulas como fósseis - diatomito. Além disso, a construção da parede de sílica fornece características indispensáveis para a identificação das espécies. As valvas carregam a maior parte das características taxonômicas e o cingulo compreende em um único, ou várias séries de bandas que se formam durante o processo de divisão

celular permitindo a formação interna das células filhas (WERNER, 1966).

O método mais comum de reprodução das diatomáceas é a reprodução assexuada por divisão celular. Primeiramente há o aumento do volume celular da célula mãe (célula original), seguido pela mitose do núcleo; após este se dividir, duas valvas são formadas no interior da parede celular da célula original separando o protoplasto em dois. Com a evolução do fechamento da valva é formada a célula filha. Esta consiste, portanto, no protoplasto, núcleo e uma valva da célula original. A célula filha, no entanto, possui um tamanho celular menor do que a célula original. O processo de divisão celular em algumas espécies promove a diminuição sucessiva do tamanho celular da população. Quando um tamanho mínimo é atingido, a reprodução sexuada intervém para restabelecer o tamanho normal das espécies, por meio da formação de um zigoto denominado auxósporo (LEE, 2008).

As microalgas possuem o metabolismo diretamente relacionado com a divisão celular e o aumento de tamanho através da utilização da luz como fonte de energia (COLEMAN; PROSCHOLD, 2005) e apresentam um rápido crescimento, podendo produzir grandes biomassas microalgais de acordo com as condições ambientais (MATA *et al.*, 2010).

As microalgas possuem a capacidade de ajustar ou alterar a sua estrutura interna, composição bioquímica e fisiológica, podendo sintetizar uma enorme variedade de compostos em consequência das condições ambientais ou de cultivo (RENAUD *et al.*, 2002). As conjunções dos fatores químicos, físicos e biológicos influenciam no cultivo da microalga e essa interação pode ser favorável ou desfavorável ao seu crescimento. Os fatores físico-químicos estão relacionados aos efeitos provocados pela luz, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (RICHMOND, 2004).

A temperatura é um fator determinante para o crescimento das células. Cada microalga possui características distintas na taxa específica de crescimento (HU, 2004); enquanto algumas espécies têm seu crescimento desacelerado a temperaturas inferiores a 18°C, outras espécies são características de regiões polares com temperaturas abaixo de zero grau Celsius (BARSANTI; GUARTIERI, 2014). Para algumas espécies de microalgas a elevação de temperatura pode diminuir a quantidade de ácidos graxos insaturados e aumentar o percentual de ácidos graxos saturados (THOMPSON *et al.*, 1992), o que contribui para produção de biodiesel de melhor qualidade com maior número de cetano e maior estabilidade oxidativa.

O pH do meio de cultura tem tendência de aumentar com o aumento da densidade celular e com a idade do cultivo, devido ao consumo de CO₂ por parte das microalgas. No caso de uma elevada densidade celular na cultura, poderá ser adicionado CO₂ para permitir a correção de pH, podendo este atingir o seu máximo durante o crescimento das microalgas (SAYEGH; MONTAGNES, 2011). A luminosidade está relacionada à fotossíntese; se o aumento de luz for muito elevado pode resultar em fotoinibição e se for deficiente as células não terão o desenvolvimento desejado. Geralmente utilizam-se em cultivo fotoperíodos de um ciclo dia/noite, o fotoperíodo ideal varia entre as espécies (BARSANTI e GUALTIERI, 2014).

O uso da aeração é necessário em cultivos densos ou com grande volume. O borbulhamento de ar dentro dos frascos de cultivo impede a sedimentação das células; esse processo auxilia as células a aproveitarem melhor a luz, melhora a distribuição de nutrientes de forma homogênea e favorece a troca de gases devido ao aumento da produtividade microalgal (LOURENÇO, 2006).

Em termos nutricionais, os principais elementos que influenciam o crescimento microalgal são nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre e potássio e silicato (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004). Quanto aos micronutrientes, geralmente as microalgas requerem ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto. Algumas também necessitam de baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GUILLARD, 1975).

Algumas microalgas, além de crescerem fototroficamente, podem crescer em condições heterotróficas, utilizando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico. Nesse sistema usam-se simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). As microalgas têm demonstrado facilidade em crescer rapidamente em cultivos heterotróficos e essa possibilidade é promissora para a biotecnologia, pois os cultivos heterotróficos permitem altas produtividades e elevado grau de controle do sistema de cultivo em comparação com sistemas fototróficos.

Tecnologicamente, a biomassa gerada pelas microalgas pode ser processada para a produção de biocombustíveis e produtos químicos de alto valor agregado. Entre os biocombustíveis destacam-se:

- Biodiesel - a partir de extração e transesterificação de lipídeo (RIBEIRO, 2012).

- Bioetanol – a partir da quebra das paredes celulares das microalgas com a consequente liberação de hidratos de carbono e quebra das grandes moléculas de carboidrato. Após a quebra um fermento é adicionado à biomassa e inicia-se a fermentação, transformando o açúcar em etanol por meio das leveduras (COSTA e MORAIS, 2011).

- Bio-óleo – por craqueamento térmico ou pirólise (RIBEIRO, 2012).

Atenção maior tem sido dedicada ao biodiesel, devido ao elevado teor de lipídeos de algumas microalgas e sua produtividade.

Alguns estudos concluíram que a capacidade produtiva de energia dos ácidos graxos das microalgas pode ser muito maior do que ao correspondente melhor ácido graxo oriundo de culturas agrícolas tradicionais (DEMIRBAS, 2011; SUALI; SARBATLY, 2012), o que são pontos positivos em relação ao fator ambiental, social e econômico, fortalecendo o tripé da sustentabilidade.

Entretanto, apesar de ser promissora a produção de lipídeos de microalgas para biocombustíveis, em escala industrial os custos ainda são altos, superando inclusive o custo de produção do biodiesel de plantas oleaginosas, o que torna essa prática ainda inviável. Para tornar o biodiesel de microalgas competitivo no mercado frente ao combustível de petróleo, faz-se necessário procurar estratégias para reduzir custos e aumentar a produtividade (CHISTI, 2007).

As microalgas, portanto, têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas devido a sua relevância econômica, nutricional e ecológica (ANTELO *et al.*, 2010).

A DIATOMÁCEA *Asterionellopsis glacialis*

A diatomácea *Asterionellopsis glacialis* foi utilizada neste trabalho devido a sua importância ecológica às praias dissipativas da costa sul brasileira, apresentando altas densidades e a alta frequência da ocorrência na região (RORIG; GARCIA, 2003). *Asterionellopsis glacialis* apresenta o seguinte enquadramento sistemático abaixo (ALGAEBASE, 2014).

Reino: Chromista
Filo: Ochrophyta (= Heterokonthophyta)
Classe: Fragilariophyceae
Ordem: Fragilariales
Família: Fragilariaceae

Gênero: *Asterionellopsis*

Espécie: *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round

Essa espécie pertence a um grupo ecológico restrito de diatomáceas, chamadas de diatomáceas de zona de arrebentação, que formam densas acumulações em certas praias arenosas (TALBOT *et al.*, 1990). Em todo o mundo há apenas seis espécies de diatomáceas de zona de arrebentação: *Aulacodiscus kittonii* Arnott, *Aulacodiscus africanus* Ehrenberg, *Anaulus australis* Drebes at Schulz, *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round, *Asterionella socilis* Lewin et Norris e *Attheya armatus* (T. West) Crawford, (CAMPBELL, 1996).

Primeiramente acreditava-se que as acumulações fossem florações de microalgas, entretanto estudos demonstraram que se trata de um fenômeno natural e não possui relação com florações (que são dependentes de poluição ou mudanças das condições ambientais). As acumulações de diatomáceas ocorrem pelo acúmulo de células na superfície da água aderidas a bolhas de ar que são formadas durante a arrebentação das ondas (LEWIN; SCHAEFER, 1983; TALBOT *et al.*, 1990). Essas diatomáceas possuem um mecanismo que lhes permite aderir a bolhas e dessa forma flutuam na superfície da água (SLOFF *et al.*, 1984).

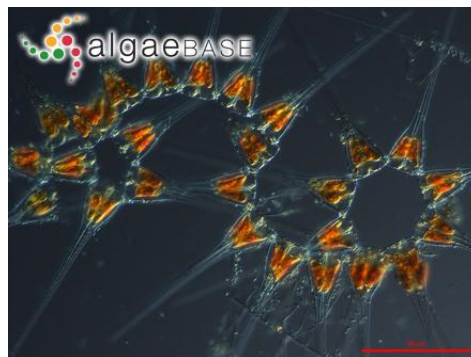
Foi descrito por BROWN E MCLACHLAN (2006), para a espécie *Anaulus australis*, o rebuscado mecanismo de migração nos ambientes de praia. Durante o dia, as células deixam o sedimento e entram na coluna da água aderidas a bolhas das espumas. Nesse momento ocorre a divisão celular; a maioria das células se divide assim que a espuma alcança a superfície da água. No meio da tarde a divisão celular está completa e as diatomáceas começam a produzir um muco que lhes permite aderir aos grãos de areia, perdem a flutuabilidade e começam a sedimentar junto aos grãos de modo que durante a noite a maioria das células está aderida ao substrato. Essa migração vertical é característica de diatomáceas epibentônicas.

Segundo BROWNE MCLACHLAN (2006), além desse sistema de migração vertical as diatomáceas de zona de arrebentação apresentam mais dois sistemas característicos: migração *on/offshore* e migração por eventos de tempestade. No caso da migração *on/offshore*, as células sobem para a superfície durante o dia, sendo levadas pelas ondas, e à tarde, quando as células afundam, podem ser transportadas para fora da zona de arrebentação por correntes de retorno e depositadas além da

zona de arrebenção, tornando-se disponíveis para a reentrada na zona de arrebenção na manhã seguinte. Trata-se, portanto, de um padrão de migração horizontal sobreposta à migração vertical diária. No caso da migração por eventos de tempestade, uma grande proporção das diatomáceas que estão alojadas no sedimento são ressuspensas com o aumento da energia das ondas. Por este motivo os eventos de acumulações são associados a eventos de frente fria.

Asterionellopsis glacialis é uma espécie cosmopolita, encontrada não só nas acumulações de zona de arrebenção, mas também em zonas costeiras do mundo todo, especialmente onde há aportes continentais próximos. As células formam colônias em forma de estrelas helicoidais conectadas pelo ápice da extremidade da valva alongada (pólo basal) por blocos de mucilagem secretado. Esse muco é composto por polissacarídeos (KOOISTRA *et al.*, 2007). Alterações na água do mar podem influenciar na ligação entre as células, assim como na secreção de muco, afetando a formação da cadeia. Isso, no entanto, pode influenciar na flutuabilidade, facilitar a predação, dificultar a absorção de luz e de nutrientes (KOOISTRA *et al.*, 2007). Além disso, células em cadeias espirais de *A. Glacialis* podem desenvolver um microambiente com altas concentrações de CO₂ ou pH mais elevado no centro da cadeia. Segundo Barcelos e Ramo e colaboradores (2014), ambientes com elevada concentração de CO₂ promovem o aumento das cadeias de *A. Glacialis* diminuindo, portanto, a sua flutuabilidade e capacidade competitiva (Figura 1).

Figura 1. Detalhe de cadeias de células de *Asterionellopsis glacialis*.



Fonte: Algaebase

Asterionellopsis glacialis é comumente dominante em acumulações de diatomáceas na América do Sul (GIANUCA, 1983;

ODEBRECHT et al., 1995), Argentina (GAYOSO; MUGLIA, 1991; SUNESEN; EUGENIA, 2007), Uruguai (BAYSSE et al., 1989), Austrália (MCLACHLAN; HESP, 1984) e sub-dominante na África do Sul (DU PREEZ et al., 1989), Tasmânia (MCLACHLAN; HESP, 1984) e Nova Zelândia (RAPSON, 1954). Geralmente estão presentes em abundância no final da primavera e no verão nos mares da Europa (KRABERG, 2010).

No Brasil, *Asterionellopsis glacialis* é a espécie mais registrada nas acumulações de diatomáceas de zona de arrebentação da costa sul brasileira mas *Anaulus australis* também ocorre, sendo que em muitos locais ambas as espécies co-ocorrem (AGUIAR; CORTE-REAL, 1973; RÖRIG et al., 1997; 2003; RÖRIG; GARCIA, 2003; RÖRIG et al., 2006; ODEBRECHT et al., 2010).

As acumulações de *A. glacialis* promovem alterações na coloração da água devido à liberação de compostos orgânicos pelas células fitoplanctônicas, resultado do crescimento exponencial na biomassa das microalgas (CAMPBELL; BATÉ, 1997). Este exsudato apresenta grande variedade de produtos bioquímicos de baixo peso molecular (SONDERGAARD; SCHIERUP, 1982) e é composto principalmente por ácido glicólico, polipeptídios, aminoácidos, lipídios e vários polissacarídeos (AARONSON, 1971; IGNATIDES; FOGG, 1973).

Estudos também comprovam que o aparecimento de manchas de *A. glacialis* promove uma redução drástica na abundância de bactérias, o que indica uma forte dissociação entre o aparecimento de diatomáceas e o crescimento bacteriano. Além disso, *A. glacialis* é conhecida pela produção de um antibiótico com propriedade antimetabólica (AUBERT et al., 1970).

Segundo SPOLAORE e colaboradores (2006), a biotecnologia associada às microalgas começou realmente a se desenvolver em meados do século XX. Atualmente existem inúmeras aplicações comerciais de microalgas. Por exemplo,

- podem ser usadas para melhorar o valor nutricional de produtos alimentícios e rações para animais, devido à sua composição química;
- desempenham um papel crucial na aquicultura;
- podem ser incorporados em produtos cosméticos.

Além disso, elas são cultivadas como uma fonte de moléculas altamente valiosas como os lipídeos, que compreendem ácidos graxos, gorduras e ceras, etc. (VOET; VOET, 2007). Nos sistemas biológicos, os lipídeos funcionam como componentes de membrana, produtos de

reserva, metabólitos e como fonte de energia. Sendo assim, os lipídeos se classificam em: lipídeos de armazenamento (lipídeos neutros), triacilgliceróis (TAGs) e lipídios de membrana (lipídeos polares), fosfolipídios, glicolipídios e esteróis (NELSON; COX, 2002).

Os ácidos graxos geralmente são monocarboxílicos e podem ser representados pela forma RCO_2H . Na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, podendo ser saturada – que não possui insaturações (duplas ligações) na molécula - ou conter uma ou mais insaturações – que possuem uma (monoinsaturados) ou mais de uma (poli-insaturados) insaturações na molécula. O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula. (GRAZIOLA *et al.*, 2002)

Os ácidos graxos presentes nas microalgas podem ser de cadeia molecular curta, contendo 2 a 4 átomos de carbono, ou de cadeia molecular longa, contendo acima de 12 átomos de carbono. Os ácidos graxos de cadeia curta são fluidos em temperatura ambiente, enquanto que, nas mesmas condições, os de cadeia longa fornecem gorduras sólidas (GRAZIOLA *et al.*, 2002).

O conteúdo lipídico da biomassa microalgal pode variar entre 1 - 40% do peso seco, podendo chegar a 85% dependendo das alterações nas condições de cultivo e sinergismo entre as condições (BECKER, 2004), como intensidade luminosa (CAMPENII *et al.*, 2013), temperatura (THOMPSON *et al.*, 1992; JIANG *et al.*, 2014) e principalmente nutrientes adicionados (RADMANN; COSTA, 2008) .

A maior parte da composição lipídica das microalgas está na forma de triacilgliceróis, que podem ser considerados a principal fonte energética da maioria dos organismos (NELSON; COX, 2011). Os triacilgliceróis são moléculas apolares formadas por três ácidos graxos esterificados ao glicerol, na estrutura desses trigliceróis os principais ácidos graxos encontrados são os de cadeia longa, entre os quais podemos destacar: saturados – ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0); insaturados – ácido oleico (C18:1, ω -9) e o ácido linoleico (C18:2, ω -6) (OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002).

A formação de ácidos graxos de cadeia carbônica curta é semelhante em células de plantas superiores, animais, fungos, bactérias e microalgas, entretando nas microalgas a insaturação da cadeia carbônica ocorre a partir do C18 e o alongamento da cadeia carbônica gera ácidos de cadeia longa, que não são habituais em ácidos graxos de plantas (ROBLES-MEDINA *et al.*, 1998).

Ácidos graxos de cadeia longa (C20-C22) geralmente estão presentes em microalgas e o teor varia de espécie para espécie

(ROBLES-MEDINA *et al.*, 1998). Cada espécie produz diferentes teores de lipídeos, pois tem a habilidade de alterar seu metabolismo de acordo com as mudanças nas condições do meio de cultura (BEHRENS, 1996). Normalmente, os ácidos graxos de cadeia curta (C14-C18) são maioria em *Chlorella spp.*, mas elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa e de hidrocarbonetos também ocorrem em algumas espécies de microalgas (HUANG *et al.*, 2010), por exemplo, o ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω -3) representa a maior fração entre os ácidos graxos encontrados na diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (REITAN *et al.*, 1994).

Dentre os ácidos graxos produzidos por algumas espécies de microalgas destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados, pertencentes à família ômega-6 como os ácidos linoleico (18:2 ω -6, LA) e o araquidônico (20:4 ω -6, AA), e à família ômega-3 como os ácidos alfa-linolênico (18:3 ω -3, LNA), eicosapentaenoico (20:5 ω -3, EPA) e docosahexaenoico (22:6 ω -3, DHA). Dentre as espécies conhecidas de microalgas que apresentam quantidades significativas de AGPI das famílias ômega-3 e ômega-6, encontram-se representantes Prymnesiophyceae (*Isochrysis sp.* e *Pavlova lutheri*), Bacillariophyceae *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira sp.* e *Odontella aurita*, Dinophyceae (*Cryptocodinium cohnii*) e Chlorophyceae (ZHUKOVA; AIZDAICHER, 1995). Segundo Pulz e Gross (2004), os AGPI de origem microalgal têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais. A composição de ácidos graxos de algumas espécies de microalgas é apresentada nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Ácidos graxos saturados e poli-insaturados de diferentes espécies de microalgas da classe Bacillariophyceae.

Classe	Ácidos graxos	14:0	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	16:1n-9	16:1n-7	16:4n-3	16:4n-1	18:1n-9	18:1n-7	18:2n-6	18:3n-6	18:4n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3	
	<i>Asterionella glacialis</i>	29,2	20,8	2,3	-	-	-	-	28,7	2,4	3,1	2,3	1,9	1,7	-	-	-	3,1		VISO, MARTY, 1988
	<i>Cymbella affinis</i>	19,0	26,0	3,2	-	0,1	-	33,9	-	-	1,5	2,8	5,9	1,3	-	-	-	0,6	0,1	VISO, MARTY, 1989
	<i>Nitzschia closterium</i>	8,5	33,2	5,1	0,8	1,1	0,1	0,6	25,5	0,5	0,8	4,0	2,8	2,7	0,7	1,0	1,4	2,6	1,9	VISO, MARTY, 1990
	<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	8,8	22,3	1,7	0,1	0,2	1,8	0,2	32,7	2,4	3,2	1,5	1,6	4,1	2,8	0,2	-	12,5	0,8	VISO, MARTY, 1991
	<i>Thalassiosira</i> sp.	21,1	34,9	2,1	-	-	1,1	2,9	19,0	0,3	2,8	3,4	0,3	1,7	1,2	1,9	-	1,7	-	VISO, MARTY, 1992
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	24,8	27,9	1,4	-	-	-	0,3	24,9	-	7,1	1,3	1,9	-	-	0,3	-	3,8	0,1	VISO, MARTY, 1993
	<i>Skeletonema costatum</i>	12,7	9,4	2,2	-	-	-	-	19,0	-	1,3	2,6	1,6	1,6	0,2	-	15,4	2,3		ZHUKOVA; AIZDAUCHER, 1995
	<i>Nitzschia frutula</i>	3,2	16,5	0,6				25,3			2,7	1,7	0,6	0,6	0,4	11,2	6,5	7,1		LIANG et al., 2000
	<i>Nitzschia incerta</i>	1,0	26,2	2,3				46,3			1,4	3,6						7,2	1,1	LIANG et al., 2000
	<i>Navicula pellucida</i>	4,2	25,3	0,9				37,1			1,3	1,5	0,9	1,1	0,3	0,2	0,2	8,7	2,1	LIANG et al., 2000

Tabela 2. Ácidos graxos saturados e poli-insaturados de diferentes espécies de microalgas.

Classe	Ácidos graxos	14:0	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	16:1n-9	16:1n-7	16:3n-5	16:4n-1	18:1n-9	18:1n-7	18:2n-6	18:3n-6	18:4n-3	20:3n-6	20:5n-3	22:6n-3	
Chlorophyceae	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0.3	10.6	0.3	-	-	-	-	4.0	23.9	-	1.7	0.5	5.2	3.2	1.3	0.3	0.4	-	ZHUKOVA; AZDAACHER, 1995
	<i>Dunaliella maritima</i>	0.4	11.8	0.4	-	-	-	-	2.7	22.6	-	2.1	0.4	4.1	3.2	-	-	-	-	ZHUKOVA; AZDAACHER, 1995
	<i>Dunaliella salina</i>	0.5	17.8	1.5	-	-	-	-	0.8	18.2	-	2.8	0.6	6.1	2.5	-	-	0.1	-	ZHUKOVA; AZDAACHER, 1995
	<i>Chlorella sp.</i>	2.0	19.6	3.3	-	-	-	-	6.2	-	0.3	5.7	1.6	11.8	0.3	0.5	-	1.3	-	ZHUKOVA; AZDAACHER, 1995
	<i>Nannochloris sp</i>	1.8	15.0	1.0	-	-	-	16.2	-	-	-	3.9	53.9	0.6	1.0	5.8	-	-	-	VISO; MARTY, 1993
Prymnesiophyceae	<i>Chrysofla stipitata</i>	23.6	18.9	10.0	-	-	-	0.2	3.2	-	22.3	5.7	5.3	0.6	2.3	-	-	-	3	VISO; MARTY, 1993
	<i>Chrysofla lamellosa</i>	26.6	17.1	3.5	-	-	-	2.3	4.3	-	24.3	5.3	5.5	0.7	3.3	-	-	0.3	0.5	VISO; MARTY, 1993
	<i>Hymenomonas elongata</i>	1.3	37.7	2.0	-	-	-	6.8	0.3	-	8.3	0.9	13.5	-	7.9	-	-	1.3	1.2	VISO; MARTY, 1993
	<i>Emiliana kuyleyi</i>	36.5	15.5	1.8	-	-	-	1.9	2.9	-	11.4	7.6	0.8	-	4.4	-	-	-	1.5	VISO; MARTY, 1993
	<i>Isochrysis spp</i>	14.3	16.7	6.1	1.0	-	-	3.3	-	-	-	10.7	-	5.3	4.2	-	-	-	-	CAMPOS et al., 2010
Bacillariophyceae	<i>Pavlova lutheri</i>	13.1	15.1	1.0	-	-	-	30.4	-	-	3.1	0.7	1.5	2.2	4.2	4.2	3.7	19.1	1.5	ZHUKOVA; AZDAACHER, 1995
	<i>Tetraselmis galbana</i>	12.2	18.8	0.7	-	-	-	3.3	-	-	24.7	-	5.3	-	11.3	0.9	-	-	15.4	REITAN et al., 1994
	<i>Tetraselmis variana</i>	1.0	28.8	2.1	-	-	-	0.7	3.8	3.8	8.4	6.2	3.3	1.6	0.2	8.0	5.8	-	-	VISO; MARTY, 1993
	<i>Tetraselmis suecica</i>	1.0	36.8	3.0	-	-	-	0.7	0.9	8.2	11.4	2.7	5.0	6.7	4.2	0.8	-	-	-	VISO; MARTY, 1994

Atualmente várias espécies de microalgas são cultivadas visando à obtenção dos chamados ácidos graxos essenciais - essenciais ao funcionamento do organismo humano, porém não são sintetizados por este devido à ausência de enzimas específicas responsáveis pela formação das duplas ligações nesses compostos (CURI *et al.*, 2002). São considerados ácidos graxos essenciais o EPA e DHA. A maior parte das microalgas possui enzimas necessárias para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados, essa síntese ocorre no estroma do cloroplasto (GILL; VALIVETY, 1997; NELSON; COX, 2002).

Os ácidos graxos são essenciais para funções celulares normais e atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa como ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexapentaenoico (DHA). A presença desses compostos no organismo evita distúrbios neurológicos e visuais, também desempenham papel preponderante no sistema nervoso e na funcionalidade de diversos órgãos (POMPÉIA, 2002). A ausência de tais nutrientes à dieta está associada à aceleração do processo de envelhecimento, síndromes cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2000), colorretais (DE CAMPOS *et al.*, 1999); arteriosclerose (RAPOSO, 2010), doenças autoimunes (SIMOPOULOS, 2002), câncer (SOARBIERI; PACHECO, 1998) e que podem em casos mais sérios levar à morte.

O consumo de ácidos graxos essenciais, como ômega-3, promove vasodilatação, tem efeito anti-inflamatório, diminui os níveis de colesterol e triacilglicerídeos e inibe a agregação de plaquetas. O consumo de ácidos graxos essenciais ômega-6 promove vasoconstrição, aumenta a agregação de plaquetas, regula os níveis de colesterol e possui efeitos anti-inflamatórios (LIMA *et al.*, 2000; DE CAMPOS *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2002).

Em relação ao biodiesel, nem todos os lipídeos produzidos por microalgas são satisfatórios para a produção de biocombustíveis. No entanto, segundo CHISTI (2007), uma grande quantidade de triacilgliceróis adequados para este fim pode comumente ser encontrada nesses organismos. Estudos comprovam que é possível alterar a concentração de lipídeos em células fitoplanctônicas através da manipulação dos meios de cultivo (SHEEHAN *et al.*, 1998). Durante períodos de estresse ambiental, incluindo o crescimento sob deficiência de nutrientes, os ácidos graxos das microalgas podem variar em sua concentração e qualidade (PÉREZ, 2007).

A síntese de ácidos graxos pode ser dividida em três etapas principais: síntese de acetil coenzima A (acetil CoA) no citoplasma; síntese de ácido graxo saturado com 16-18 carbonos e posterior dessaturação e alongação da cadeia de carbonos e síntese dos acil gliceróis (triacilgliceróis) (HUANG *et al.*, 2010).

A chave para a síntese de acetil-CoA nas microalgas é o gliceraldeído fosfato (GAP). A formação de GAP ocorre nos cloroplastos e inclui as reações, fase clara e ciclo de Calvin. O gliceraldeído fosfato é exportado para o citoplasma e direcionado para a síntese de açúcares ou é oxidado através da via glicolítica até piruvato, onde podem produzir energia ou servir de substrato para a síntese de outros compostos, entre eles os ácidos graxos. Nas microalgas a principal via de obtenção de acetil-CoA é a via glicolítica (HUANG *et al.*, 2010). Então, a acetil-CoA é convertida a malonil-CoA, sendo esta reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase, a qual é utilizada a fim de direcionar a reação de condensação para estender os grupos acil a ácido esteárico (C18:0) e uma dessaturase forma o ácido oléico (C18:1) (WEN; CHEN, 2003). Os compostos finais são ácidos graxos saturados com 16-18 carbonos, que se formam através de ciclos de ácidos graxos saturados. A síntese de ácidos graxos insaturados nas algas acontece da mesma forma que nas plantas, animais, fungos e bactérias. O alongamento da cadeia e posterior dessaturação acontece a partir de ácidos graxos com 18 carbonos (saturados ou não) através de elongases e dessaturases, cujo produto final com C20-C22 carbonos varia de espécie para espécie nas microalgas (HUANG *et al.*, 2010)

As microalgas, assim como outros organismos, são capazes de sintetizar e estocar acil-gliceróis como fonte de energia e carbono. Geralmente, a síntese se dá a partir do L- α -fosfoglicerol, oriundo da via glicolítica e acil-CoA. A transferência de resíduos de acilas se dá a partir da acil-CoA transferase, que forma o ácido lisofosfatídico que, através da L-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase, transfere outra acila formando o ácido L- α -fosfatídico. Este composto é a origem dos fosfolípidios ou depois da ação de uma fosfatase e incorporação do terceiro resíduo de acila, através da diacilglicerol aciltransferase, se transforma em triacilglicerol (HUANG *et al.*, 2010).

Os ácidos graxos das famílias ω -9, ω -6 e ω -3 são formados a partir dos precursores oleato (ácido oléico, C18:1 ω -9), linolenato (ácido linoléico C18:2 ω -9,12) e α -linolenato (ácido α -linolénico, C18:3 ω -9,12,15), respectivamente, e de uma série de reações de insaturação e alongamento. O ácido oléico (C18:1 ω -9) é dessaturado por uma dessaturase Δ 12 para formar o ácido linoléico (C18:2 ω -6) e uma

dessaturase $\Delta 15$ para formar o ácido α -linolénico (C18:3 ω -3). Em especial, a biossíntese dos ácidos graxos da família ômega-3, tal como o EPA, ocorre através de uma série de reações, a qual pode ser dividida em 2 etapas distintas. A primeira é a síntese “de novo” do ácido oléico (C18:1 ω -9) a partir de acetato. Essa etapa é seguida pela conversão do ácido oléico em ácido linoléico (C18:2, ω -6) e ácido α -linolénico (C18:3, ω -3) (WEN; CHEN, 2003). Este último é dessaturado por uma dessaturase $\Delta 6$, formando o ácido estearidônico (C18:4, ω -3). A seguir ocorre um alongamento da cadeia com adição de 2 átomos de carbono formando o ácido eicosatetraenoico (C20:4, ω -3). Este, por sua vez, é dessaturado por uma dessaturase $\Delta 5$, formando o ácido eicosapentaenoico (C20:5, ω -3). Após nova reação de alongamento forma-se o ácido gordo docosapentaenoico (C22:5, ω -3), que é dessaturado por uma dessaturase $\Delta 4$, formando o ácido docosaexanoico (C22:6, ω -3) (WEN; CHEN, 2003).

Em geral, as microalgas apresentam altas concentrações de lipídeos, que podem servir de matéria-prima para a fabricação de detergentes, borracha, compostos graxos nitrogenados, graxa, tecidos, aditivos alimentares, cosméticos e medicamentos. A utilização desses lipídeos poderá reduzir o uso de derivados do petróleo como fonte de energia e de gorduras animal e vegetal para o consumo humano (AARONSON; DUBINSKY, 1982).

Aproximadamente 75% da produção anual de biomassa microalgal foi direcionada para a fabricação de suplemento alimentar. Esses produtos são manufaturados principalmente na forma de pó, tabletes e cápsulas (BECKER, 2004). Alguns produtos à base de extratos microalgais vêm sendo lançados no mercado de alimentos funcionais como, por exemplo, bebidas, iogurtes e massas (PULZ; GROSS, 2004).

O maior interesse associado aos produtos derivados de microalgas se deve à composição bioquímica das microalgas, que está associada a processos envolvidos na captação e assimilação de nutrientes. Quando há deficiência de alguns nutrientes há a tendência de o organismo aumentar a captação desse nutriente, modificando a sua eficiência metabólica. Essa captação está associada ao aumento dos sítios de captação no plasmalema e à indução de isoenzimas com diferentes propriedades cinéticas, que aumentam a afinidade por esses nutrientes (BEARDALL, YOUNG, ROBERTS, 1991).

Alguns fatores nutricionais podem aumentar ou diminuir a produção lipídica das microalgas (Tabela 3), como a concentração de

nitrogênio (SPOLAORE, 2006), deficiência em silício e em fósforo (WERNER, 1977), concentração de ferro (LU, WANG, ZHOU, 2008) e presença de fontes de carbono para microalgas heterotróficas (CÉRON GARCÍA, 2000).

Tabela 3. Efeitos no perfil de lipídeos diante alterações nas condições de cultivo.

Tipo de cultura	Efeito no perfil graxo
Alta concentração de nitrogênio Aumento na intensidade luminosa	Diminuição da quantidade de C22 Aumento de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumento de ácidos graxos insaturados EPA; DHA
Presença de manganês Alta concentração de CO ₂	Aumento do conteúdo lipídico Aumento de ácidos graxos insaturados
Baixa concentração de potássio	Aumento do conteúdo lipídico

Fonte: Modificado de Behrens, 1996.

A disponibilidade de luz, nutrientes e CO₂ são conhecidas por apresentarem efeito inverso à composição e ao conteúdo lipídico. Sob condições limitantes de nutrientes, a taxa de crescimento diminui e o metabolismo celular é redirecionado para a acumulação de triacilglicerídeos como reserva energética, ao invés da síntese de fosforolipídeos ou proteínas, como normalmente ocorre em condições ótimas e altas taxas de crescimento (BEHRENS, 1996). A composição de triacilglicerídeos se faz em sua maioria por ácido palmítico e palmitoléico; os fosforolipídeos são compostos principalmente por ácidos graxos poli-insaturados. Esses resultados levam a crer que a taxa de crescimento determina o teor de ácidos graxos e sua proporção na biomassa; como o perfil de ácidos graxos tende a ser mais rico em EPA, as taxas de crescimento são mais elevadas (GRIMA, CAMACHO E FERNÁNDEZ, 1999).

A reação das diatomáceas na deficiência de nitrogênio e de fosfato é caracteristicamente diferente da deficiência de silicato - Si(OH)₄. As células sem o suprimento de fosfato externo continuam a se dividir por mais de três gerações e em seguida começam a acumular carboidratos. O teor de lipídeos não aumenta durante essa primeira etapa (WERNER, 1966).

Nos primeiros estágios da deficiência de nitrogênio ocorre um acúmulo de lipídeos mais evidente, durante vários dias uma taxa de apenas 14 - 16 μ g lipídeos.mg.proteína⁻¹.hora⁻¹, que é de apenas 10% da taxa produzida pelas células diante da deficiência em Si(OH)₄. No geral pode-se dizer que muitas espécies de diatomáceas reagem mais rapidamente à deficiência de Si(OH)₄ do que à deficiência de qualquer outro nutriente (exceto água e fonte de carbono) (WERNER, 1966).

Os ácidos graxos encontrados em muitas células de diatomáceas em seu ambiente natural são uma reação da deficiência de silicato. Da mesma forma, porém em menor proporção, a produção de ácidos graxos também é resultado da deficiência de nutrientes como nitrogênio e fosfato. Portanto, os ácidos graxos são produtos de armazenamento de diatomáceas que crescem sob condições de estresse, alterando o metabolismo microalgal e preparando a célula para o período de privação e não sob condições ideais (WERNER, 1977).

A deficiência de nitrogênio pode aumentar o conteúdo lipídico de algumas microalgas; isso acontece devido à mudança do metabolismo microalgal, que, diante da limitação de nitrogênio, passa a produzir componentes de reserva como ácidos graxos saturados (ALONSO *et al.*, 2000). A limitação de nutrientes reduz severamente a taxa de crescimento de *Nannochloropsis* sp. O conteúdo de clorofila-a diminui com a redução de nitrato e a redução de nitrogênio promove o aumento de ácidos graxos saturados e a diminuição de ácidos graxos poli-insaturados como EPA (SUKENIK *et al.*, 1993).

Macedo e Alegre (2001) cultivaram a microalga *Spirulina maxima* em meios com 2,5 g.L⁻¹ KNO₃ (2,5N) considerando como meio padrão o meio com 2,0 g.L⁻¹ KNO₃ (0,2N) e em ausência de nitrogênio (0,0N) nas temperaturas de 25°C e 35°C. A composição da biomassa celular seca apresentou a 35°C um aumento médio de 2,9 vezes do meio 0,2N e de 2,8 vezes do meio com ausência de nitrogênio, em relação ao meio padrão. A 25°C o aumento foi de 3,2 vezes do meio 0,2N e de 3,1 do meio com ausência de nitrogênio em relação ao meio padrão, concluindo que, para a espécie *Spirulina máxima*, a produção de biomassa é maior a temperaturas amenas e sob a ausência de nitrogênio.

SUKENIK (1991) testou a resposta da taxa de crescimento de *Nannochloropsis* sp. cultivado a diferentes temperaturas. A taxa de crescimento máxima foi registrada à temperatura de 25°C. Acima e abaixo dessa temperatura ótima, a taxa de crescimento diminuiu. O conteúdo celular dos ácidos graxos totais e EPA diminuiu à medida que a temperatura aumentou. No entanto, a distribuição relativa de EPA

apresentou valor máximo a temperatura ligeiramente abaixo do ótimo para o crescimento. A produtividade de ácidos graxos poli-insaturados aumenta ligeiramente com o aumento da temperatura. Porém, acima da temperatura ótima de crescimento, a produtividade de EPA tende a declinar devido à baixa síntese de ácidos graxos e à redução na taxa de crescimento.

XIN *et al.* (2010) estudaram o efeito da limitação de nitrogênio e fosfato na acumulação de lipídeos da microalga de água doce *Scenedesmus* sp. Foi utilizado a concentração de 2.5 mg.L^{-1} de nitrogênio e de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de fosfato. As microalgas submetidas a baixas concentrações de nitrogênio e fósforo apresentaram acumulação lipídica de 30% e 53%, respectivamente, por biomassa seca.

O fósforo tem importantes funções na célula, estando envolvido com a transferência de energia e constituição de moléculas como o ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucléicos e fosfoenzimas (LOURENÇO, 2006). COHEN; KHOZIN-GOLDBERG (2006) observaram os efeitos da limitação de fosfato na produtividade de ácidos graxos em *Monodus subterraneus*. Os cultivos foram realizados com meio cultura Blue Green (BG11). As concentrações de fosfato testadas foram $175 \mu\text{M K}_2\text{PO}_4$ (cultivo controle) e $52,5 \mu\text{M}$, $17,5 \mu\text{M}$ e $0,0 \mu\text{M K}_2\text{PO}_4$ (restrição de fosfato). A proporção de ácidos graxos poli-insaturados, EPA, decaiu de acordo com a limitação do nutriente no meio, as concentrações encontradas foram de 28,2 %, 20,8 %, 19,4% e 15,5% (total de ácidos graxos), respectivamente. Por outro lado, houve um incremento da proporção de lipídeos polares e triacilglicerídeos.

A deficiência de fósforo no meio afeta o perfil lipídico da célula com mais intensidade do que afeta a quantidade de lipídios produzidos, já que o fósforo faz parte dos fosfolipídios. A limitação deste nutriente direciona o metabolismo da microalga para a produção de triacilglicerídeos saturados e lipídeos neutros, e ainda causa uma diminuição de ácidos graxos poli-insaturados (SIRÓN, GIUSTI, BERLAND, 1989).

Segundo JUSTIC *et al.* (1995), a razão de Redfield ideal para o fitoplâncton é Si:N:P= 16:16:1, especialmente para diatomáceas, que são constituintes abundantes do fitoplâncton costeiro. As diatomáceas possuem demanda alta por silício tanto quanto de nitrogênio, recomendando-se a proporção igual desses dois elementos. Em situações de limitação por silício, verifica-se a diminuição da espessura da parede celular dessas algas (LOURENÇO, 2006). A baixa disponibilidade de silício induz nas diatomáceas o aumento na produção de lipídios (KYLE *et al.*, 1986). Possivelmente, por não conseguir construir a frústula,

devido à falta de silício, a diatomácea, sob estresse metabólico, passa a produzir substâncias que permitam a sua sobrevivência, como lipídeos de reserva.

O carbono é o elemento necessário em maiores quantidades para algas, pois constitui em torno de 50% da biomassa seca. Algumas algas autotróficas fixam apenas carbono inorgânico, enquanto outras assimilam outras fontes de carbono, como CO₂ e carbono orgânico. Se a alga consegue assimilar mais carbono, aumenta sua produção de carboidratos, proteínas e lipídios (DERNER, 2006).

A irradiância também promove efeito indireto sobre a produção e conteúdo lipídico da microalga. As células são expostas a diferentes valores de irradiância. Os valores máximos atingem as células localizadas na superfície e os valores mínimos ou zero no centro. As células expostas à alta irradiância sofrem fotoinibição enquanto as células localizadas no centro sofrem fotolimitação; esses dois fenômenos são responsáveis pela taxa de crescimento microalgal. Um estudo realizado com cultivos controlados de *Isochrysis galbana* mostrou que altos valores de irradiância promoveram alta fotoinibição, diminuindo a porcentagem de ácidos graxos por biomassa seca, principalmente EPA (MOLINA-GRIMA et al., 1995).

Portanto a taxa de crescimento determina não somente a produção de biomassa, como também a composição lipídica dessa biomassa. Quando a taxa de crescimento é alta, o conteúdo lipídico formado por ácidos graxos poli-insaturados é relativamente baixo (ácidos graxos estruturais). Em condições ideais de crescimento o teor de lipídeos é alto e constituído em maioria por ácidos graxos saturados.

2. Hipóteses de trabalho

O presente trabalho considerou estudos prévios realizados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul sobre a ecologia e ecofisiologia da diatomácea de zona de arrebentação *Asterionellopsis glacialis*, para explorar de forma experimental as possíveis aplicabilidades dessa espécie. Trata-se de um trabalho de bioprospecção, baseado em informações ecológicas fundamentais já estabelecidas na literatura ou nos bancos de dados de laboratórios regionais.

Assim, sabendo-se:

- Da ocorrência frequente de eventos de floração/acumulação da espécie em praias arenosas dissipativas e intermediárias da região (RÖRIG, 1997; RÖRIG et al., 1997; RÖRIG; GARCIA, 2003; RÖRIG et al., 2006; ODEBRECHT et al., 2010)

- Da extrema dominância dessa espécie nesses ambientes (RÖRIG; GARCIA, 2003; RÖRIG et al., 2006; ODEBRECHT et al., 2010);

- Da reconhecida influência dessa alga sobre populações bacterianas ambientais (ABREU et al., 2003);

- Da possibilidade de cultivo da espécie em laboratório (RIQUELME et al., 1988; ABREU et al., 2003);

- Do fato de essa espécie ser o principal item alimentar de importante recurso pesqueiro regional (tainha) (VIEIRA SOBRINHO, 1985);

- Do, em geral, relativamente alto teor em lipídeos das diatomáceas (GRAHAM *et al.*, 2012); formularam-se as seguintes hipóteses de trabalho:

- *A. glacialis* apresenta elevada taxa de crescimento, sendo exigente quanto à concentração de nutrientes e mostrando elevado potencial para produção de biomassa útil em cultivos com condições controladas e otimizadas.

- *A. glacialis* produz exsudatos com potenciais atividades antimicrobianas (fungos e bactérias) e/ou alelopáticas capazes de explicar, ao menos em parte, a sua extrema dominância no plâncton das praias onde ocorre.

- *A. glacialis* apresenta teor de lipídeos relativamente elevado, o qual pode ser otimizado manipulando-se as condições de cultivo, para considerá-la um recurso importante na obtenção de lipídeos para biodiesel e ácidos graxos para propósitos nutracêuticos.

Para testar essas hipóteses, foram adotadas abordagens experimentais convencionais, envolvendo o isolamento, cultivo e análise da biomassa e exsudatos produzidos pela espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar aspectos ecofisiológicos de cepas da diatomácea de zona de arrebentação *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round e caracterizar sua composição bioquímica sob diferentes condições de cultivo.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar se células em cultivo apresentam alterações morfológicas na frústula e reprodução sexuada com a presença de auxósporo.
- Comparar o crescimento das células cultivadas em meio de cultura F/2 (GUILLARD, 1975) e meio de cultura IMR (EPPLEY *et al.*, 1967) sob condições de cultivo padrão.
- Verificar se *Asterionellopsis glacialis* promove efeito de inibição ao crescimento de bactérias heterotróficas, fungos e sob a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*.
- Determinar o teor de lipídeos e o perfil de ácidos graxos da biomassa de *Asterionellopsis glacialis* obtida em cultivo.

4. METODOLOGIA

No presente trabalho, duas cepas de *Asterionellopsis glacialis* foram estudadas:

I. Cepa isolada a partir de uma floração na praia de Navegantes – SC, no ano de 2009.

II. Cepa isolada a partir de uma floração na praia do Rincão Içara – SC, em 2013.

Ambas são praias arenosas expostas, intermediárias a dissipativas, com registro frequente de florações ou acumulações de diatomáceas de zona de arrebentação (*surfdiatoms*). No caso da praia de Navegantes, duas espécies foram registradas: *Asterionellopsis glacialis* e *Anaulus australis*. Na acumulação registrada na praia Rincão, somente *A. glacialis* foi registrada. Na Tabela 4 são apresentados os dados da localização das duas praias citadas, dos pontos de coleta do material, além de características morfodinâmicas no momento das coletas.

Tabela 4. Características dos locais onde foram coletadas as amostras das quais foram isoladas as cepas de *Asterionellopsis glacialis* utilizadas nesse trabalho.

Características	Cepa (a) - Navegantes	Cepa (b) - Rincão
Localização	Praia de Navegantes, litoral centro-norte de SC	Praia do Rincão litoral sul de SC
Coordenadas	26°51'34''S e 48°38'04''W	28°42'12''S e 49°16'54''W
Extensão da praia arenosa	9,7 km (dos molhes do rio Itajaí até promontório da Ponta Negra)	62 km (da barra do rio Araranguá até o Cabo e Santa Marta)
Dados ambientais durante a coleta		
Data	Setembro de 2009	Julho de 2013
Largura da zona de arrebentação*	200 m	260 m
Altura de onda*	100 cm	120cm
Período de onda*	12 s	14 s
Salinidade [#]	29	30
Vento	Sul, moderado	Sudeste, moderado

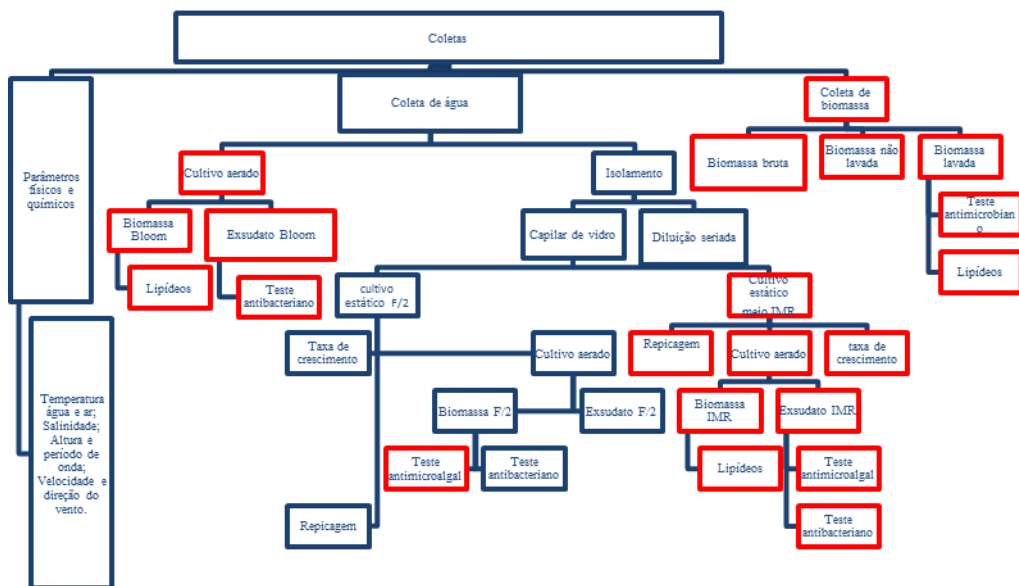
*Determinação visual, conforme RÖRIG (1997).

[#]Determinado com refratômetro.

Para facilitar a compreensão, os procedimentos sequenciais estão apresentados na Figura 2. O isolamento, condições de cultivo padrão e

manutenção das cepas foram realizados no Laboratório de Ficologia (LAFIC) da UFSC, assim como as taxas de crescimento e morfologia em diferentes meios de cultivo (F/2 e IMR). A inibição da bioluminescência bacteriana (LUMISTOX) foi testada no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA) da UNIVALI, no município de Itajaí. Os testes de inibição do crescimento de microrganismos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da UFSC. A atividade alelopática sobre a diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* foi avaliada no LAFIC da UFSC. A liofilização da biomassa microalgal foi feita no Laboratório de Algas Marinhas (LCA) da UFSC. O teor e caracterização do perfil de lipídeos foram realizados na EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, no município de Itajaí. Com a cepa Rincão foram aferidos dados ambientais, coleta de água para isolamento unialgal, para posterior produção de cultivo estático e aerado para produção de taxa de crescimento, biomassa, testes antimicrobiano, antibacteriano e antimicroalgal e para produção de cultivo aerado para extração lipídeos, coleta de biomassa ambiental para a realização de testes antimicrobiológicos e extração de lipídeos. Com a cepa Navegantes foram aferidos dados ambientais, coleta de água para isolamento unialgal, a fim de posterior produção de cultivo estático para produção de taxa de crescimento e teste antibacteriano e para produção de cultivo aerado para extração de lipídeos.

Figura 2. Sequência de procedimentos executados desde a coleta até os processamentos. Obs.: os procedimentos em cor azul foram executados com ambas as cepas (Rincão e Navegantes); os procedimentos em cor vermelha foram realizados apenas com a cepa Rincão.



4.1. Amostragens

Foram realizados estudos com cepas de origens diferentes: cepa Navegantes, previamente coletada na praia de Navegantes no município de Navegantes no ano 2009, e cepa Rincão, coletada na praia do Rincão, no município de Içara, no ano 2013 (Figura 3).

A cepa Rincão foi mais intimamente trabalhada. Com a cepa Rincão a coleta de água foi realizada com balde em superfície na zona de arrebentação a profundidade de 50 cm. Imediatamente após a coleta foram determinadas temperatura e salinidade para fins de ajuste do meio de cultura a ser posteriormente confeccionado para as tentativas de isolamento de *Asterionellopsis glacialis*. A biomassa microalgal da cepa Rincão foi coletada com arrasto de rede de plâncton com malha de 20 μ m com sucessivos arrastos para concentração do material. A biomassa da cepa Rincão foi acondicionada em potes, disposta em caixa térmica e levada ao Laboratório de Ficologia (LAFIC) da UFSC para posterior processamento.

Ao chegar ao LAFIC, a biomassa foi dividida em três porções. Uma parte foi lavada com água e passada por peneira e o excesso de água foi retirado; essa biomassa foi denominada “biomassa lavada”. Outra parte foi somente passada por peneira para retirada do excesso de água; essa porção foi denominada “biomassa não lavada”. A terceira parte não sofreu tratamento posterior à coleta, portanto esta parte foi denominada “biomassa bruta”. Todos os potes foram acondicionados em freezer, até o momento da utilização do material para as análises.

A coleta da cepa Navegantes foi realizada em 2009 e previamente isolada pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA) da UNIVALI. Os dados apresentados neste trabalho foram previamente processados, porém não foram divulgados até o presente momento.

Figura 3. Acumulações da diatomácea *Asterionellopsis glacialis* na zona de arrebentação e sobre a areia na praia do Rincão, município de Balneário Rincão - SC.



Fonte: Honorato, 2013.

4.2. Metodologia da análise morfológica

Para a verificação das possíveis alterações morfológicas, uma alíquota do cultivo de *Asterionellopsis glacialis* era colocada em uma lâmina de vidro, fixada com uma lamínula e levada ao microscópio óptico. Após essa observação prévia, a amostra era levada ao microscópio LEICA (MODELO DM 2500) para fotografar as células desejadas. Para parâmetros de comparação, células de *A. glacialis* oriundas do ambiente natural foram fotografadas assim que a amostra chegou da coleta.

4.3. Teste inibição da bioluminescência da bactéria *Vibrio fischeri* – lumistox

O lumistox é um bioensaio baseado nas alterações da bioluminescência da bactéria *Vibrio fischeri* quando exposta a algum estressante ou tóxico. Quanto maior for a inibição da emissão de luz, em relação a um controle, maior é a toxicidade da amostra (ISO 11348-1, 1998). O teste lumistox foi realizado em triplicata em diferentes concentrações dos exsudatos dos cultivos das duas cepas e no caso da cepa Rincão foi realizado também com o exsudato retirado do ambiente natural (Acumulação Rincão). Esses testes foram realizados no

Laboratório de Microbiologia Aplicada - LAMA (UNIVALI), sob a responsabilidade do Oceanógrafo César Augusto Stramosk.

Para a condução dos testes foram utilizadas diferentes diluições do exsudato, conforme a tabela 4, além de controles constituídos pelos meios de cultura da bactéria *V. fisheri*. A temperatura era mantida pelo termobloco experimental do sistema lumistox. O inóculo de bactérias constituía a cultura principal, que foi adicionada às amostras (exsudatos). Após a ambientação das amostras e do controle, era feita a inoculação do cultivo padrão (500 µL) de bactérias e determinada a luminescência inicial de cada amostra e do controle utilizando-se um Luminômetro lumistox 300 Hach-Lange, e a final após 30 minutos de exposição de células (Tabela 5).

Tabela 5. Características dos testes lumistox realizados com os exsudatos de cultivos e do ambiente natural (floração de *Asterionellopsis glacialis*).

Origem	Exsudato	Diluições	Temperatura
Cepa Navegantes	Cultivo	3%; 6%; 12%; 25%; 50%	15°C
Cepa Rincão	Cultivo F/2 Cultivo IMR	50%; 80%	15°C
Acumulação Rincão	Ambiente Natural	50%; 80%	15°C

4.4. Teste inibição de crescimento microalgal – *Phaeodactylum tricorutum*

Para o teste de inibição do crescimento microalgal, aplicado para verificação de efeito alelopático, utilizaram-se apenas os exsudatos enriquecidos oriundos do cultivo de *Asterionellopsis glacialis* em meio f/2. Foram realizados 5 tratamentos com triplicatas cada, conforme Tabela 6, totalizando 15 frascos. Em cada frasco foi colocado o volume determinado e inoculado 5 mL de cultivo de *Phaeodactylum tricorutum*. No momento da montagem do teste (T0) uma alíquota foi retirada, após o inóculo ser realizado e cultivo ser homogeneizado, fizeram-se as leituras de clorofila-a *in vivo* e turbidez no espectrofotômetro (750 nm) (ANEXO III). Após as leituras essa alíquota foi fixada com lugol 4% para posterior contagem de células. Os

frascos foram depositados em bancada, no cepário, sob condições de cultivo padrão. As mesmas leituras foram feitas nos tempos T72 e T96.

Tabela 6. Características do teste de inibição do crescimento microalgal, teste realizado em triplicata (A, B, C).

Identificação das amostras	Volume de exsudato enriquecido (mL)	Volume de meio (mL)
100 A	100	0
100 B	100	0
100 C	100	0
50 A	50	50
50 B	50	50
50 C	50	50
25 A	25	75
25 B	25	75
25 C	25	75
10 A	10	90
10 B	10	90
10 C	10	90
0 A	0	100
0 B	0	100
0 C	0	100

4.5. Taxa de crescimento dos cultivos

Para determinar a taxa de crescimento do cultivo foram montados dois sistemas. Um sistema feito com auxílio de um shaker, a fim de analisar a diferença da taxa de crescimento das células sob sistema de agitação. E outro sistema estático, feito em bancada. Foram montados dezesseis frascos erlenmeyer de 250 mL, boca larga. O teste foi feito em quatro réplicas, totalizando em oito frascos com meio de cultura f/2 e oito frascos com meio de cultura IMR, sendo quatro frascos de cada meio de cultura dispostos em shaker e quatro frascos dispostos em bancada. Foram inoculados em cada frasco, 5mL de cultura de *A. glacialis*, sendo 4 frascos semeados em meio f/2 e quatro frascos semeados em meio IMR. Estes ficaram depositados em bancada dentro do cepário, nas condições de cultivo padrão. Da mesma forma 4 frascos semeados, em meio f/2 e 4 frascos semeados, em meio IMR foram colocados em agitação em um shaker na câmara de cultivo do LAFIC – macroalgas. Os frascos ficaram sob agitação 24h por dia, sob condições

de cultivo padrão. No T0 (dia da montagem do teste) 3mL de amostra dos cultivos foram retirados, após homogeneização, para leitura de turbidez e clorofila *a in vivo*. Após as leituras, essa amostra foi fixada com duas gotas de lugol 4% para posteriores contagens. As leituras e a fixação de amostra foram feitas nos tempos, T0, T48h, T72h, T96h, T120h e T144h. As contagens foram feitas no microscópio óptico (200x) em câmara de Sedgewick-Rafter.

4.6. Quantificação do fitoplâncton

A quantificação foi efetuada por contagem dos organismos presentes num volume conhecido, usando câmaras de contagem de Sedgewick-Rafter com volume de 1 mL (50 x 20 mm x 1 mm de profundidade). Faz-se a contagem do quadrado central, a fim de contar 100 células, caso esse valor não seja atingido, contam-se 5 campos à direita ou à esquerda para fazer a próxima contagem e assim sucessivamente até atingir as 100 células necessárias. Adotou-se como critério a contagem de células com 50% ou mais da área para dentro do campo de contagem.

A partir dos dados obtidos foram calculadas as taxas de crescimento e duplicação conforme COOMBS; HALL (1989), através das equações exponenciais:

Equação 1. Equação para cálculo da taxa de crescimento de *Asterionellopsis glacialis*.

$$\mu = \frac{(\ln N_f - \ln N_0)}{T_f}$$

Onde:

μ é a taxa de crescimento celular exponencial;

N_0 é a densidade de células inicial (cél.mL⁻¹);

N_f é a densidade de células final (cél.mL⁻¹);

T_f é o intervalo de tempo entre a medida inicial e final (48h).

Foi calculada também a taxa de crescimento diária através da equação (2):

Equação 2. Equação para cálculo da taxa de crescimento diário de *Asterionellopsis glacialis*.

$$\mu_D = \mu \times 24$$

Onde:

μ_D é a taxa de crescimento celular exponencial diário;
 μ é a taxa de crescimento celular exponencial por hora;
 24 é o tempo em horas referentes a um dia.

Por fim, foi calculado o tempo de duplicação diária (G) – tempo necessário para a população duplicar a sua densidade, conforme a equação (3):

Equação 3. Equação do tempo de duplicação da população de *Asterionellopsis glacialis*.

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_D}$$

Onde:

G é o tempo de duplicação da população;
 Ln (2) é o logaritmo natural de 2 a base 10;
 μ_D é a taxa de crescimento celular exponencial diário;

4.7. Teste inibição ao crescimento microbiano

A atividade biológica anti-microbiana foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Esse teste foi feito com a biomassa lavada da floração de 13/07/2013; a metodologia foi seguida de acordo com DE ALMEIDA *et al.* (2012): 10g de biomassa, os quais foram lavados com formiato de amônio (0,5M) na proporção de duas partes de formiato de amônio para uma parte de biomassa, a fim de remover o sal. Deixou-se o formiato agir durante 5 minutos, centrifugou-se a amostra durante cinco minutos a 4.000 rpm, retirou-se o sobrenadante e a biomassa sedimentada no tubo foi ressuspensa com mais formiato de amônio (2:1). Repetiu-se esse processo por mais três vezes. A biomassa dessalinizada foi exaustivamente extraída com etanol 92%. O extrato resultante foi concentrado sob pressão, resultando em uma fração aquosa, uma fração de hexano e uma fração de butano. Todas as frações foram testadas para propriedades antifúngicas, antibacterianas e antiprotzoa. As atividades antimicrobianas foram avaliadas por difusão de disco (OLIVEIRA *et al.*, 2005) com algumas modificações. Os discos de papel de filtro (6mm) foram impregnados com 20 μ l das soluções de extratos e em seguida

colocados em placas ágar Muller-Hinton (HIMEDIA), os quais foram inoculados com o microrganismo a ser testado de acordo com o protocolo padrão descrito por CLSI/NCCLS (2002). As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, e depois de 18h os diâmetros da zona de inibição foram medidos. Discos de papel contendo somente os solventes foram usados como controle negativo. Os organismos testados foram:

- *Clostridium sporogenes*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Streptococcus pneumoniae*,
- *Streptococcus pyogenes*,
- *Enterobacter cloacae*,
- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Salmonella typhimurium*,
- *Shigella flexneri*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Candida albicans*,
- *C. tropicalis*.

4.8. Lipídeos

As biomassas dessalinizadas das cepas foram colocadas em placas de petri, devidamente identificadas e liofilizadas. A biomassa liofilizada foi transferida para tubos falcon de plástico (15mL), identificados e congelados. Para a extração dos lipídios, 100mg de liofilizado foram solubilizadas em 5mL de uma solução 5% de HCl em metanol, mantidos a 80°C por uma hora. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água e 2mL de hexano, com forte agitação dos tubos das amostras e deixado para separação de fases. A fase de hexano foi transferida para outro tubo e o processo foi repetido 3 vezes. Em um bloco aquecido a 60°C e sob fluxo de ar, o hexano foi evaporado até a secura. A massa de lipídeos resultante do processo serviu então para a determinação de lipídeos totais e já se constituiu na amostra a ser utilizada no processo de derivatização para determinação do perfil de ácidos graxos, utilizando-se a metodologia proposta por HARTMAN;

LAGO (1973), com pequenas modificações. No tubo contendo os lipídeos, adicionou-se 1mL da solução de saponificação (KOH a 0,5N em metanol), sendo deixados para reação em bloco de digestão a 80°C por uma hora. Após esta etapa, adicionaram-se 2,5 mL de solução metanólica ácida 1M (H₂SO₄) nos tubos onde foram levados novamente ao bloco e deixados por mais uma hora a 80°C.

Após a esterificação os tubos foram deixados para resfriar e posteriormente adicionaram-se 2mL de n-hexano, para extrair os ésteres metílicos de ácidos graxos. Após agitação dos tubos no vórtex, aproximadamente 1mL da fase n-hexano foi transferida para um tubo adequado ao injetor automático do cromatógrafo gasoso.

Para a determinação do perfil de ácidos graxos foi utilizado cromatógrafo a gás Shimadzu 17A, equipado com o detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP2340 (60m x 0,25mm x 0,2um). As temperaturas do detector e injetor foram de 260°C e 240°C. A temperatura da coluna inicia-se com 120°C por 5 minutos e aumenta gradualmente 4°C.min⁻¹ até a temperatura final de 240°C, permanecendo assim por 5 min. O gás de arraste (H₂) apresenta velocidade linear de 17cm.s⁻¹, o que corresponde ao fluxo na coluna de 0,67mL.min⁻¹. O volume de injeção – 1 uL – foi normalmente utilizado com razão de split de 1:100, podendo tanto o volume quanto a razão de split serem alterados em função da concentração da amostra. A identificação dos picos é efetuada pela comparação dos tempos de retenção dos picos característicos com o padrão de ésteres metílicos (Supelco 37 components FAMES Mix, ref. 47885-U). A quantificação foi realizada pela razão da área do pico do éster metílico de interesse, em relação à área total dos picos identificados, expressa em percentagem.

5. RESULTADOS

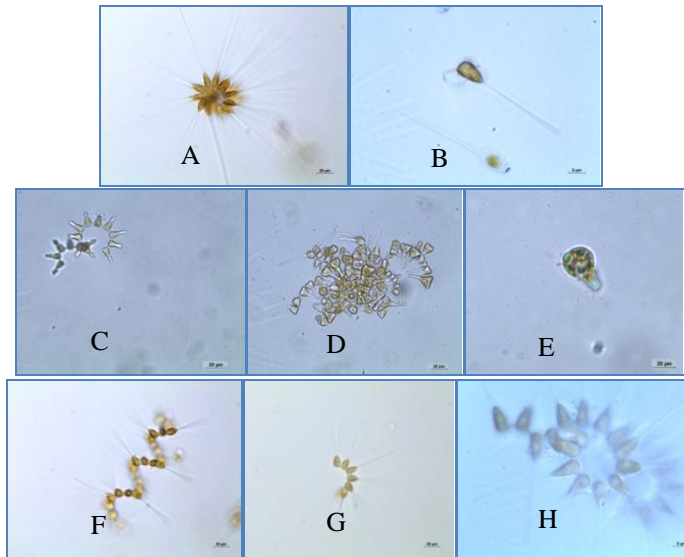
5.1. Morfologia celular de *Asterionellopsis glacialis* no ambiente natural e em cultivo

As amostras coletadas durante o evento de floração/acumulação de 07 de julho de 2013 mostraram composição monoespecífica, sendo constituída basicamente por *Asterionellopsis glacialis*. A densidade de células alcançou $6,3 \times 10^7$ cél.L⁻¹. As células apresentavam grandes colônias, espículo longilíneo e sem deformações (Figura 5 A e B).

Com o acompanhamento microscópico dos cultivos já isolados, verificou-se que os mantidos em meio F/2, após 15-20 dias, apresentaram alterações morfológicas, entre elas, encurtamento da frústula, contorção do espículo (torna-se curvo) e presença de auxósporos. A quantidade de células por colônia diminuiu, resultando em aproximadamente 3-5 células por colônia, aumentando o número de células isoladas. O cultivo em meio F/2 teve também grande ocorrência de grumos de células (Figura 5 C, D e E).

Os cultivos mantidos em meio de cultura IMR apresentaram pouca modificação morfológica com o passar do tempo, ausência de auxósporos e pouca ocorrência de grumos de células. As células se encontravam em forma de colônias, formadas por aproximadamente 6-8 células; chegando a 12 células, notou-se que o número de colônias aumentava com o desenvolvimento do cultivo, ou seja, no final da fase estacionária as células se agrupavam em colônia com maior número celular (Figura 5 F, G e H).

Figura 4. Fotomicrografias ópticas em campo claro de *Asterionellopsis glacialis*. (A) células em cadeia espiralada, coletadas em campo. Escala: 20 μm ; (B) célula individual de ambiente natural, escala: 8 μm ; (C) células em cadeia em meio de cultura F/2, escala: 20 μm ; (D) células em grumos em meio de cultura F/2, escala: 20 μm ; (E) possível auxósporo em meio de cultura F/2, escala: 20 μm ; (F, G e H) células em cadeia em meio de cultura IMR, escala: 20 μm



5.2. Parâmetros ecofisiológicos das cepas de *Asterionellopsis glacialis*.

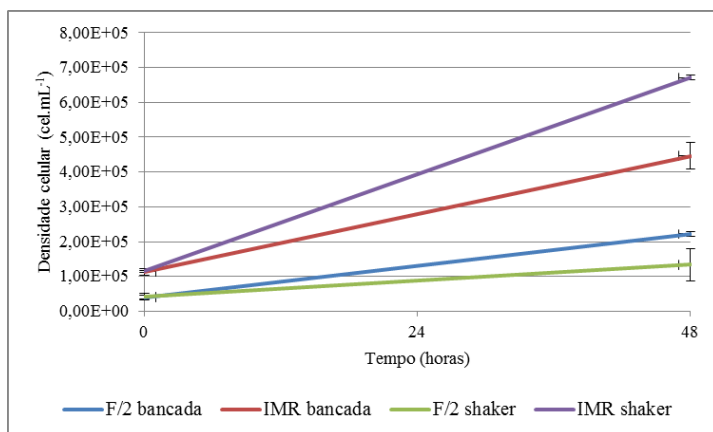
As curvas de crescimento foram obtidas através da média da triplicata. Observando as curvas de crescimento microalgal obtidas (Figura 6), nota-se que o meio de cultura IMR possibilitou um grande incremento celular nas primeiras 48h do cultivo. A densidade celular no cultivo estático chegou à máxima de $4,4 \times 10^4$ céls.mL⁻¹ e a densidade celular no cultivo com aerado chegou à máxima de $6,7 \times 10^4$ céls.mL⁻¹. Em ambos os sistemas, logo após o pico de incremento celular, após 48h do início, o cultivo começou a decair; entre 48h e 96h ocorreu o declínio da densidade celular e após 96h houve a estagnação do sistema.

Diferentemente do meio IMR, o meio de cultura F/2 gerou melhor resultado quando aplicado a sistemas de cultura estáticos (Figura 6). A densidade celular do cultivo com aeração alcançou o pico de $1,3 \times$

10^4 cél.mL⁻¹ em 48h, decaindo até o 72h e estabilizando após este período, mantendo o número de células estável; entretanto, observou-se que após 144h ocorreu a junção das células em grumos, o que inviabilizou a contagem celular.

No cultivo realizado sob sistema estático, a densidade celular chegou a $2,2 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ em 48h, decaindo progressivamente até 144h, chegando à mínima de $1,2 \times 10^4$ cél.mL⁻¹, quando não foi mais possível realizar a contagem celular devido aos grumos formados.

Figura 5. Gráficos da densidade celular de *Asterionellopsis glacialis* (cél.mL⁻¹) comparativa entre meios de cultura F/2 e IMR. (azul) densidade celular em meio de cultura IMR em sistema estático e aerado (vermelho); (b) densidade celular em meio de cultura F/2 em sistema estático (verde) e aerado (roxo). Barras de erro padrão calculado através do desvio padrão das médias das réplicas.



A taxa de crescimento, ou taxa de divisão diária variou de acordo com o meio de cultura e com o método empregado ao cultivo. A taxa de crescimento das células de *A. glacialis*, por hora (μ), por dia (μ_D) e o tempo necessário para uma divisão completa (G), cultivadas no meio de cultura F/2 e IMR em sistema estático e aerado são apresentadas na tabela 7. As taxas foram calculadas pela média das triplicatas, considerando como tempo final o período de maior densidade celular registrada em 72h.

Tabela 7. Taxas de crescimento de *Asterionellopsis glacialis* em meio de cultura F/2 e IMR, em sistema de cultivo estático e aerado. Taxa de crescimento por hora (μ (h^{-1})); Taxa de crescimento por dia (μ_D (d^{-1})); Taxa de divisão (G(dias)). Valores referentes ao tempo de maior densidade celular, 72h.

	μ (h^{-1})	μ_D (d^{-1})	G (dias)
F/2 - estático	0,03	0,85	0,81
F/2 - aerado	0,02	0,57	1,24
IMR - estático	0,02	0,68	1,00
IMR - aerado	0,03	0,88	0,78

A taxa de crescimento de *A. glacialis* oriunda da cepa Navegantes foi obtida com cultivos à salinidade 28 PSU devido às condições de aclimação da cepa. A taxa de crescimento obtida foi de $0,4 \text{ dia}^{-1}$. Taxa semelhante à encontrada na cepa Rincão cultivada em meio de cultura f/2.

5.3. Inibição da bioluminescência bacteriana

Os resultados dos testes LUMISTOX realizados com os exsudatos livres de células e enriquecidos com nutrientes referentes aos meios de cultura empregados no crescimento das células mostraram que tanto o exsudato produzido pelo cultivo direto das células coletadas no ambiente (Exsudato Rincão) quanto os obtidos de cultivos (Navegantes e Rincão; meios F/2 e IMR) apresentaram inibição negativa, ou seja, estimularam a luminescência das bactérias. De maneira geral, quanto maior a concentração do exsudato, maior foi a estimulação (Tabela 8). Para esta bactéria, portanto, o exsudato não exerce efeito negativo.

Tabela 8. Resultados dos testes de inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* utilizando exsudatos de *Asterionellopsis glacialis* obtidos do ambiente e de cultivos em diferentes meios.

Exsudato	Diluição (%)	Inibição da fluorescência
Bloom Rincão	50	-5,33
	80	-9,55
F/2 - Rincão	50	-7,90
	80	-4,59
IMR - Rincão	50	-8,96
	80	-10,69
	3	-12,23
F/2 - Navegantes	6	-57,31
	12	-90,24
	25	-110,28
	50	-226,38

5.4. Teste inibição de crescimento microbiano (Bactérias gram positivas, gram negativas e fungos) e microalgal (*Phaeodactylum tricornerutum*)

A solução de exsudato obtido através do cultivo direto das células de ambiente natural (Exsudato Rincão) não mostrou efeito inibitório sobre quaisquer microrganismos testados.

Analisando o comportamento de *Phaeodactylum tricornerutum* em contato com o exsudato enriquecido com nutrientes em diferentes concentrações (Tabela 9) nota-se que em 72 horas houve um estímulo ao crescimento celular em todas as concentrações de exsudato, sendo que, na concentração 100% de exsudato, foi observada a menor densidade celular, de $7,9 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ e no exsudato com 0% de concentração foi observado a maior densidade celular, chegando a $3,9 \times 10^5$ cél.mL⁻¹.

No tempo final, passadas 96 horas do início do teste, nota-se que houve uma estabilidade na densidade celular nas concentrações 100%, 50% e 25%. Na concentração 10% houve uma menor densidade celular de $9,2 \times 10^5$ cél.mL⁻¹, e na concentração 0% de exsudato foi constatada a maior densidade celular de $1,4 \times 10^6$ cél.mL⁻¹.

Tabela 9. Densidade celular de *Phaeodactylum tricornutum* sob diferentes concentração de exsudato enriquecido com nutrientes referentes à composição do meio de cultura F/2.

Concentração exsudato (%)	Meio F/2	Densidade celular (célis.mL ⁻¹)		
		T0	T72	T96
0	100	2,4 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶
10	90	1,1 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	9,2 x 10 ⁵
25	75	3,6 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶
50	50	3,6 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵
100	0	5,3 x 10 ⁴	7,9 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵

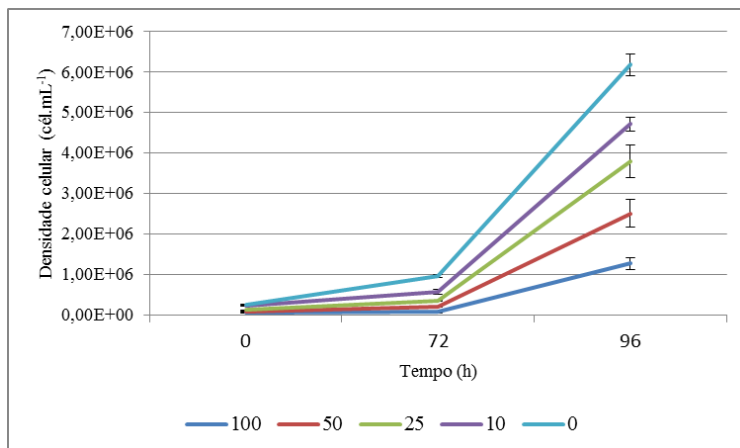
Calculando-se as taxas de crescimento celular (μ) para o intervalo total de tempo (96h), percebeu-se uma taxa maior na concentração 0% de exsudato e menores taxas nas demais concentrações, mas não sendo proporcionais às concentrações (Tabela 10).

Tabela 10. Taxas de crescimento por hora, por dia e taxa de duplicação de *Phaeodactylum tricornutum* sobre diferentes concentrações de exsudato.

Concentração de exsudato (%)	μ h ⁻¹	μ d ⁻¹
0	0,042	1,02
10	0,021	0,52
25	0,036	0,88
50	0,036	0,87
100	0,033	0,79

Analisando-se as plotagens de densidade celular de *P. tricornutum* nos três tempos e nas cinco concentrações de exsudato, nota-se novamente que não houve um padrão nítido de inibição ou indução no incremento celular entre os diferentes tempos de amostragem sob as concentrações de exsudato testadas (Figura 8).

Figura 6. Gráfico da densidade celular (cél.mL^{-1}) de *Phaeodactylum tricornutum* sob a influência do exsudato de *Asterionellopsis glacialis* em diferentes concentrações durante 96 horas. (azul) 0% de exsudato; (vermelho) 10% de exsudato; (verde) 25% de exsudato; (roxo) 50% de exsudato; (azul claro) 100% de exsudato. Barras de erro calculadas através do desvio padrão das médias das réplicas.



5.5. Lipídeos

A análise de ácidos graxos da cepa Rincão foi feita em duplicata para as células cultivadas em meio IMR e em triplicata para as células cultivadas em meio f/2. Com as células provenientes do campo não foi possível realizar a extração de lipídeos.

A porcentagem de ácidos graxos totais foi maior em meio IMR do que em meio F/2, entretanto a porcentagem de EPA foi maior em meio f/2 do que em meio IMR, ao contrário dos ácidos graxos saturados, que obtiveram maior rendimento em meio IMR do que em meio f/2. Em ambos foram identificados os ácidos graxos saturados, mirístico (14:0), pentadecanoico (C15:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0). E ácidos graxos polinsaturados, oleico (C18:1 ω -9), linoleico (C18:2 ω -6) e EPA (C20:5 ω -3).

A Tabela 11 apresenta o teor de ácidos graxos por massa seca, quais ácidos graxos foram identificados e a sua porcentagem. A cepa Navegantes apresentou 9,02% de teor de lipídeos por massa seca. Também foram identificados ácidos graxos saturados, mirístico (14:0) palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), araquidônico (C20:4 ω -6) e

ácidos graxos insaturados, EPA (C22:4) e DHA (C24:6), sendo que a quantidade encontrada de EPA foi 10 vezes superior à quantidade obtida com as cepas Rincão.

Todas as cepas foram lavadas anteriormente com formiato de amônio para retirar o sal presente na amostra, da mesma forma todas as cepas foram secadas através de liofilizador. Os padrões químicos utilizados na identificação dos ácidos graxos foram os mesmos.

Tabela 11. Valores médios comparativos entre a composição e teor de ácidos graxos de *Asterionellopsis glacialis* cultivadas em diferentes meios de cultura.

Ácidos graxos	IMR	F/2	Navegantes
Mirístico (C14:0)	34,18	40,80	20,2
Pentadecanoico (C15:0)	2,64	2,40	-
Palmítico (C16:0)	23,05	15,00	9,3
Palmitoleico(C16:1)	34,95	32,20	32,2
Esteárico (C18:0)	0,80	1,20	-
Oleico (C18:1 ω -9)	1,64	2,80	-
Linoleico (C18:2 ω -6)	1,34	2,00	-
 Araquidônico (C20:4 ω -6)			4,5
 EPA (C20:5 ω -3)	1,40	3,60	32,1
Lípídeos totais	13,66	11,22	9,02

6. DISCUSSÃO

6.1. Morfologia celular de *Asterionellopsis glacialis* no ambiente natural e em cultivo

Em ambiente natural essas células apresentam valvas arredondadas (pólo basal) em vista valvar ou triangular em vista cingular, que se afunila abruptamente formando uma secção longa e fina (haste), muitas vezes apresentando 3-4 vezes o comprimento do pólo basal. As células de *A. glacialis* cultivadas (condições de cultivo padrão) apresentaram algumas mudanças morfológicas com o passar do tempo, como diminuição do tamanho celular, atrofia e entortamento da haste alongada, aumento do tamanho do polo basal, tornando-se triangulares e perda de cloroplastos (MANN, 1988). Segundo Körner (1970) *A. glacialis* cultivadas durante algum tempo tendem a perder a haste alongada e passam a apresentar uma forma triangular ou quase circular.

Entretanto, as células cultivadas em meio IMR apresentaram alterações morfológicas menos evidentes ou praticamente nulas. As células mantiveram a haste alongada e reta, o pólo basal se manteve em forma arredondada, e as células não diminuíram significativamente de tamanho.

Além disso, com o passar do tempo, as células de *A. glacialis* passaram a formar cadeias celulares maiores, ao passo que as células cultivadas em meio f/2 não formaram cadeias celulares, ao contrário, com o passar do tempo as cadeias celulares desmanchavam, aumentando o número de células isoladas. BARCELOS E RAMOS e colaboradores (2014) concluíram que, quanto maior a concentração de dióxido de carbono (CO₂) no meio de cultura, seja por resultado da alta biomassa ou introduzido artificialmente, maior era o número de células formando cadeias. Isso possivelmente ocorre porque mudanças químicas na água podem influenciar a força ou a secreção de polissacarídeos de ligação (as células anexar nos ápices de válvulas por polissacarídeos que formam exalavam blocos de mucilagem), especialmente quando carregados, e, potencialmente, afetar a formação de cadeias (KOOISTRA et al., 2007). A alta biomassa produzida no ambiente de cultura aumenta a concentração de CO₂ no meio, o meio de cultura IMR promoveu maior produção de biomassa, possivelmente alta concentração de CO₂ no meio e maior número de longas cadeias celulares.

As células cultivadas em meio IMR também não apresentaram a formação de auxósporos, enquanto que células cultivadas em meio f/2 apresentaram formação de auxósporo. A forma morfológica das células em cultivo muitas vezes tende a mudar com o tempo, fazendo com que as células em algum momento cheguem a sua menor dimensão. Quando esse fenômeno acontece, há uma restituição abrupta do tamanho original das células em pouco tempo através da reprodução sexual, o qual envolve a formação de células especiais, chamado auxósporos (MANN, 1988).

No meio F/2 pode-se observar a formação dessas células, devido ao fato de elas surgirem também quando as condições ambientais não estão favoráveis (MANN, 1988).

Um dos principais diferenciais das diatomáceas em relação às outras microalgas é o fato de que elas requerem silício para o seu desenvolvimento. Existem algumas formas de calcular a concentração requerida de SiO_2 pelas diatomáceas como a área de superfície celular, volume celular, peso de SiO_2 por μm^2 ou pela porcentagem de Si por volume celular. Este último parâmetro considera que a concentração de 0,25 a 1,1 pg Si. μm^{-3} por células de diatomáceas é considerada um valor relativamente alto, por exemplo, o Si contida em *Cyclotella glomerata*, que possui um tamanho celular de 7 x 5 μm , foi calculado em 100 pg Si.célula⁻¹. *Cyclotella cryptica*, espécie de maior tamanho do que a citada anteriormente, possui uma concentração de Si de 7 a 11 pg Si.célula⁻¹, valor que corresponde a 20 a 30% de SiO_2 por peso seco. Estima-se que células menores de diatomáceas requerem uma maior concentração de sílica ao seu desenvolvimento do que células grandes (WERNER, 1966).

A concentração final de silicato de sódio em meio de cultura f/2 equivale a 0,005 Molar, enquanto a concentração de silicato de sódio em meio de cultura IMR equivale a 0,012 Molar. Portanto há mais duas vezes mais silicato no meio IMR do que no meio f/2. Outra diferença importante é a razão molar entre os nutrientes Si:N:P nesses meios, que é de 15:5:1 no meio IMR e 4,5:11:1 no meio f/2. Ou seja, além de mais silício, o meio IMR apresenta mais fósforo que o f/2. O meio f/2 é reconhecido com um meio de manutenção de diatomáceas. Já o IMR tem sido citado como meio para produção de biomassa, especialmente em espécies de crescimento rápido, que requerem mais silício e pouco tempo para a formação das frústulas (LOURENÇO, 2006).

As diatomáceas não se desenvolvem na ausência ou baixa concentração de SiO_2 no meio de cultura, pois há a inibição do crescimento, inibição da síntese de DNA e de proteínas, entre outros

(WERNER, 1977). *Asterionella formosa*, por exemplo, é uma diatomácea exigente em termos de concentração de sílica na água, e sua biomassa abaixa abruptamente em concentrações abaixo de 140 pg.l^{-1} , enquanto outras espécies ainda crescem bem nestas concentrações (VIEIRA, 2000). Estudos indicam que o elemento germânio ($\text{Ge}(\text{OH})_4$) promove a inibição do crescimento de diatomáceas devido a inibição da fotossíntese, mas não influencia no crescimento de outras microalgas. O germânio apresenta alta toxicidade e promove alterações químicas e morfológicas nas células. (LEWIN, 1966; WERNER, 1966). O germânio possui propriedades químicas semelhantes ao silicato e pode atuar como seu substituto quando a relação molar entre Ge:Si apresentar uma limitação por silicato. Lewin(1966) mostrou que o crescimento de *Navicula pelliculosa* foi completamente inibido quando a relação molar Ge:Si foi >1 .

Outro fator determinante para a morfologia celular foi o uso de aeração no sistema de cultivo. A turbulência foi fundamental para a melhora do aspecto morfológico. Segundo TALBO E BATE (1988), a diatomácea de zona de arrebentação *Anaulus birostratus* possui um mecanismo conhecido como falsa flutuabilidade, que auxilia na migração vertical das diatomáceas epibênticas, com a liberação de mucilagem que adere às células em bolhas de ar durante o dia e as células ao sedimento no final da tarde, podendo assim chegar a uma profundidade de luz ótima para a produção primária (DUPREEZ et al., 1990). Portanto, são dependentes da turbidez para realizar essa migração vertical diária.

Provavelmente *A. glacialis* é uma espécie muito exigente em silicato e dependente de fatores ambientais, os quais não puderam ser reproduzidos em cultura, resultando em crescimento menos expressivo, mas não menos eficientes, e tendência a alterações morfológicas. Portanto as células cultivadas em meio de cultivo IMR apresentaram menores deformações morfológicas do que as células cultivadas em meio de cultura f/2. As células cultivadas em meio de cultura IMR não apresentaram a formação de grupos e não houve registro de auxósporos, os quais indicam a ocorrência de reprodução sexuada ou de condições de estresse, entretanto em cultivo com meio de cultura f/2 foi observada a formação de grupos e de auxósporos.

6.2. Parâmetros ecofisiológicos das cepas de *Asterionellopsis glacialis*

A taxa de crescimento de *A. glacialis* foi maior em cultivo com meio IMR e com aeração, quando comparado aos outros sistemas de cultivo (meio IMR/estático; meio f/2/estático; meio f/2 aerado). A aeração lançada no fundo do frasco se deu através de mangueiras de silicone e pipetas, que permitiam a entrada de ar no meio de cultura.

Esse processo de mistura do meio de cultura ajuda as células no melhor aproveitamento da luz, promove uma distribuição homogênea de nutrientes, favorece a troca de gases e como consequência aumenta a produtividade microalgal (LEE *et al.*, 2006; LOURENÇO, 2006). Para um bom cultivo, a aeração é um fator muito importante para a homogeneização dos nutrientes evitando, assim, a sedimentação das microalgas (COLLA *et al.*, 2002).

KAIN E FOGG (1958) concluem que a aeração no meio de cultura também foi fator decisivo para o aumento da taxa de crescimento de *Asterionella japônica*. Com a utilização da aeração, a taxa de crescimento foi de $1,18 \text{ dia}^{-1}$, enquanto que no sistema estático a taxa foi de $0,695 \text{ dia}^{-1}$. KAIN E FOGG (1958) concluíram também que a taxa de crescimento de *A. japônica* é maior em ambiente natural $0,442 \text{ dia}^{-1}$ do que em condições de cultura $0,331 \text{ dia}^{-1}$.

A. glacialis é uma diatomácea de tamanho relativamente pequeno e possui crescimento rápido. Outras diatomáceas que possuem biovolumes pequenos como *Synechococcus subsalsus* e *Chlorella minutissima* também apresentam taxa de crescimento alta, ao passo que *Prorocentrum minimum*, espécie de maior volume celular, apresenta baixa velocidade de crescimento (LAVÍN; LOURENÇO, 2005). Espécies com biovolume baixo necessitam de maiores quantidade de silicato biodisponível e de boa qualidade quando comparado a espécies maiores, pois apresentam taxas de crescimento mais elevadas.

Nitrogênio, fósforo e silício são geralmente necessários pelo fitoplâncton numa proporção de 16N: 16Si: 1P (PARSONS *et al.*, 1984). Alguns meios de cultura não atingem a proporção de 16N: 16Si: 1P necessário para o crescimento de microalgas. Por exemplo, o meio f tem N: P > 16, o que torna o meio fósforo-limitada na fase senescente (BERGES *et al.*, 2001). Como os nutrientes tornam-se limitantes durante o crescimento, as alterações na composição bioquímica do fitoplâncton assim como a taxa de crescimento, ocorrem de forma frequente (MORRIS; MCCARTNEY, 1983).

Wolmarans (2012) verificou o crescimento das seis espécies características de zona de arrebentação de praias da África do Sul, sob diferentes concentrações de nitrato, amônio e silicato. A diatomácea *Asterionellopsis glacialis* mostrou-se exigentes a altas concentrações de

silicato biodisponível, atingindo 0,7 divisões. dia⁻¹, em concentrações de silicato acima de 30 µM, e não se desenvolveu em concentração abaixo de 1 µM. Com a cepa Navegantes foi realizada a taxa de crescimento de *A. glacialis* em meio f/2 em salinidade 28. Obteve-se uma taxa de crescimento por dia de 0,456.

A maioria das diatomáceas tem taxa de crescimento maior a salinidades de 20 – 30 ‰. GARCIA e colaboradores (2012) verificaram que a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* apresentou maiores taxas de crescimento quando cultivadas a salinidades 25‰ e 30‰. Lee e Kim (2002) realizou um estudo comto o espécies de diatomáceas, cultivando-as em diferentes concentrações de nutrientes, temperatura e salinidade. Concluíram que, das oito espécies testadas, seis obtiveram maiores taxas de crescimento em salinidades entre 20 e 30‰.

As células apresentaram melhor desenvolvimento em meio de cultura IMR. Entre os sistemas de cultivo (aerado e estático), as células se desenvolveram mais rapidamente em sistema aerado possivelmente pela homogeneização do meio de cultura, aumentando a disponibilidade de nutrientes e pelas características da espécie por serem especializadas a viver em ambientes de turbulência.

6.3. Inibição do crescimento de micro-organismos (bactérias, fungos e diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*)

Com a cepa Rincão isolada e trabalhada neste projeto foram realizados testes preliminares para prospectar possíveis atividades biológicas dos exsudatos de *Asterionellopsis glacialis* sobre microrganismos e sobre a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*.

Os exsudatos das duas cepas não reportaram atividade biológica inibidora ao crescimento dos organismos testados. Porém, a cepa Rincão apresentou uma breve inibição ao crescimento da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* e um estímulo ao crescimento da bactéria *Vibrio fischeri*.

Possivelmente os resultados foram influenciados pela baixa concentração do exsudato de cultivo se comparado ao exsudato produzido por *A. glacialis* em ambiente natural. Provavelmente, se possíveis compostos estivessem mais concentrados, os testes apresentariam mais efeitos. Leva-se em consideração também que a diatomácea *P. tricornutum* utilizada no teste de inibição de crescimento era a única disponível para o teste, porém sabe-se que esta espécie possui efeito alelopático comprovado (SHARP *et al.*, 1979), não sendo,

portanto considerada a espécie mais indicada a este teste. A espécie *Skeletonema costatum*, que é sensível a uma série de compostos químicos e utilizada em testes ecotoxicológicos, poderia ser uma boa alternativa para esse teste, entretanto, o laboratório não dispunha de cepa dessa espécie no momento dos experimentos.

Algumas diatomáceas têm demonstrado possuir atividade biológica, principalmente atribuída aos derivados de ácidos graxos livres. No entanto, um grupo de compostos interessante denominado Asterionellina foi encontrado em uma espécie de diatomácea marinha de *Asterionella*, gênero hoje mudado para *Asterionellopsis*, ou seja, provavelmente os autores se referem à mesma espécie estudada no presente trabalho. As estruturas até então sem precedentes precisam de mais estudos para confirmação, porém há o grupo diazotato, que é encontrado em vários antibióticos, tais como a neomicina e, provavelmente, tem origem biossintética semelhante (SHIMIZU, 1993).

As bactérias desempenham papel crucial para o funcionamento do ecossistema, por exemplo, na transferência de energia para os níveis tróficos superiores através da alça microbiana (AZAM *et al.*, 1983). ABREU e colaboradores (1997) verificaram a relação entre *A. glacialis* e bactérias heterotróficas na Praia do Cassino (RS). Primeiramente foi detectada a inibição do crescimento de bactérias no momento em que *A. glacialis* apresentava elevado crescimento populacional e produzia altos níveis de carbono orgânico dissolvido (DOC), seguido pelo aumento das bactérias após o início da morte das células de *A. glacialis* (fase senescente da floração). RIQUELME e colaboradores (1989) testaram a atividade biológica do exsudato de *A. glacialis* coletada durante o evento de acumulação na Baía de Maizuru sobre duas bactérias – *Pseudomonas* e *Vibriofischeri*. Verificaram que *A. glacialis* promoveu efeito estimulante ao crescimento de *Pseudomonas*, entretanto inibiu o crescimento de *Vibrio sp.*

A diferença na resposta do crescimento bacteriano associado à presença de *A. glacialis* pode ser dependente da composição química liberada pela diatomácea através do exsudato ou extrato.

De fato *A. glacialis* produz mais aminoácidos dissolvidos combinados (DCAA) do que aminoácidos dissolvidos livres (DFAA). A concentração desses aminoácidos produzidos por microalgas varia de acordo com a espécie e algumas espécies de bactérias preferem assimilar diferentes grupos de aminoácidos conforme as condições ambientais. Com o passar do tempo, durante o ciclo de vida da diatomácea a produção majoritária de aminoácidos pode mudar e isso pode explicar diferentes interações, positivas e negativas entre microalgas e bactérias

(RIQUELME *et al.*, 1989; RIQUELME; ISHIDA, 1988). LEE E BADA (1975) reportaram que no oceano aberto a concentração de DCAA é 10 vezes superior à concentração de DFAA. A alta concentração de um aminoácido pode não promover grandes respostas tanto quanto a baixa concentração do outro grupo. Entretanto não se descarta a possibilidade de, em algum período do ciclo de crescimento, o exsudato produzido por *A. glacialis* ter efeito inibidor. Além de que, diferentes condições ambientais e de cultivo podem determinar exsudatos com características diferentes.

Phaeodactylum tricornutum é uma diatomácea de tamanho relativamente pequeno e crescimento rápido, porém com pouco requerimento em sílica, uma vez que sua frústula não sofre grande impregnação de silicato e por isso consegue sobreviver em baixas concentrações de sílica (D'ELIA *et al.*, 1979). *P. tricornutum* geralmente é dominante em ambiente natural, possivelmente por ser tolerante a pH alto em torno de 9 - 9,5 e por ser tolerante a poluentes orgânicos como DDT (diclorodifeniltricoetano) e MDA (Malondialdeide) (SHARP *et al.*, 1979).

SHARP e colaboradores (1979) verificaram que *P. tricornutum* tinha uma ação inibidora ao crescimento de *Thalassiosira pseudonana* possivelmente pela produção de substâncias alelopáticas, uma vez que *P. tricornutum* não é uma espécie que produz toxinas. Da mesma forma, Chan e colaboradores (1980), utilizando a técnica de plaqueamento de algas, descobriram que o filtrado a partir de culturas na fase estacionária de três cepas de *P. tricornutum* reprimia o crescimento da diatomácea *Cylindrotheca sp.* Portanto *P. tricornutum* já possui dados anteriores de inibição ao crescimento de diatomáceas e possivelmente os compostos alelopáticos produzidos por essa diatomácea sejam mais influentes do que os possíveis compostos alelopáticos liberados por *A. glacialis*.

Acumulações de *A. glacialis* podem ser acompanhadas pela ocorrência de *Skeletonema costatum* e *Pseudo-nitzschia* spp. (VILLAC; NORONHA, 2008). Sabe-se que filtrados de *S. costatum* exercem efeito alelopático (PRINCE *et al.*, 2008; YAMASAKI *et al.*, 2010) de caráter inibitório ou estimulante ao crescimento de *A. glacialis*, de acordo com a densidade celular inicial. Da mesma forma, os estudos verificaram que o crescimento de *Skeletonema costatum* é inibido por complexos de polissacarídeos e proteínas liberadas da rafidofícea *Heterosigma akashiwo* (YAMASAKI *et al.*, 2009). Portanto, uma das espécies que supostamente seria mais adequada para a realização deste teste é *Skeletonema costatum*, que possui o ciclo de vida bem estudado,

assim como comprovadamente produz compostos alelopáticos de baixo peso molecular.

6.4. Lipídeos

A cepa Rincão apresentou considerável teor de lipídeos, sendo que a *A. glacialis* cultivada em meio IMR apresentou maior teor de lipídeos comparado às células cultivadas em meio f/2, sugerindo que as condições de cultura podem influenciar no teor e na composição de ácidos graxos produzidos.

Na cepa Navegantes foram encontrados ácidos graxos saturados e ácidos graxos polinsaturados, entre eles EPA e DHA. Na cepa Rincão foram detectados os ácidos graxos saturados e EPA. As proporções de ácidos graxos encontrados neste trabalho foram superiores porém coerentes aos encontrados no trabalho de Viso e Marti (1993). A Tabela (11) apresenta os dados comparativos.

Tabela 11. Comparação entre os ácidos graxos (% massa seca) encontrados nas cepas isoladas no presente trabalho e os ácidos graxos encontrados no trabalho de VISO E MARTI (1993).

Ácidos graxos	IMR	F/2	Navegantes	VISO; MARTI
Mirístico (C14:0)	34,18	40,80	20,2	29,2
Pentadecanoico (C15:0)	2,64	2,40	-	0,9
Palmítico (C16:0)	23,05	15,00	9,3	20,8
Palmitoleico(C16:1)	34,95	32,20	32,2	28,7
Esteárico (C18:0)	0,80	1,20	-	2,3
Oleico (C18:1 ω -9)	1,64	2,80	-	2,3
Linoleico (C18:2 ω -6)	1,34	2,00	-	1,7
Araquidônico (C20:4 ω -6)			4,5	
EPA (C20:5 ω -3)	1,40	3,60	32,1	3,2
DHA (C22:6 ω -3)	-	-	1,5	1,5

O conteúdo de lipídeos da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do massa seca e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004). Algumas diatomáceas já são conhecidas por produzirem altos teores de ácidos graxos, principalmente polinsaturados (ômega-3 e ômega-6) como *Isochrysis* spp., *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira* spp. e *Odontella*

aurita (YONGMANITCHAI; WARD, 1991). Neste trabalho o teor de lipídeos na cepa Rincão variou entre 11 % a 13% e, na cepa Navegantes, o total foi de 9%.

Ácidos graxos saturados e polinsaturados – EPA já foram encontrados em *A. glacialis* por VISO E MARTI (1993), porém em quantidades menores que as identificadas neste trabalho para a cepa Navegantes. Curiosamente, a cepa Rincão mostrou teores menores de EPA, similares aos descritos por esses últimos autores.

O tempo de cultivo pode influenciar na quantidade e nos ácidos graxos produzidos. A cepa Rincão foi processada para a obtenção dos AG durante a fase exponencial do cultivo, enquanto o processamento dos lipídeos na cepa Navegantes foi realizado durante a fase estacionária.

A classe de ácidos graxos, EPA, DHA, e TAGs, assim como a quantidade desses ácidos graxos, tende a mudar com a fase de crescimento da espécie alvo, fase estacionária e fase exponencial. Segundo TONOS e colaboradores (2002), em um experimento realizado com *Phaeodactylum tricornutum*, conclui-se que a acumulação de EPA e DHA é maior durante a fase estacionária do cultivo, indicando que o processamento de extração de AGs, se realizado na fase estacionária, possivelmente resultaria em maiores concentrações de EPA e DHA em comparação com o mesmo processamento realizado durante a fase exponencial, a qual seria mais rica em trigliceraldeídeos. Outro fator que contribui para essa mudança é a limitação de nutrientes no meio de cultura. Um desses nutrientes limitadores é o nitrogênio. A limitação por nitrogênio no meio de cultura aumenta a taxa de crescimento celular e a produção de ácidos graxos totais. Com o passar do tempo há o aumento da limitação do nitrogênio; no início dessa limitação ocorre uma maior produção de EPA e DHA e, no final, uma maior produção de TAGs.

COHEN E KHOZIN-GOLDBERG (2010) enfatizam que a acumulação de óleo em microalgas é um processo bifásico. O crescimento populacional rápido continuará desde que as condições de crescimento não sejam limitantes. Na fase chamada lipogênica, o excesso de carbono e um fator de crescimento limitante (geralmente nitrogênio) podem resultar na acumulação de lipídeos (LEMAN, 1997). Limitação de nitrogênio quando a luz está em excesso resulta em interrupção do crescimento algal. Desde que a fixação fotossintética de carbono continue, a proporção celular de C:N aumenta (MAYZAUD et al., 1989) e carbono pode ser canalizado na produção de materiais de reserva não-nitrogenados, como os triacilgliceróis (TAGs), que servem

como um *sink* para o carbono fotossinteticamente fixado. De acordo com as interpretações predominantes, TAGs são acumulados em algas para armazenamento de carbono e energia para suportar o crescimento, quando as condições se tornam favoráveis, ou seja, em situações de crescimento exponencial (POHL; ZURHEIDE, 1979). Nesse sentido, porções acilo-saturadas devem ser preferíveis, porque exigem menos energia para serem produzidas do que ácidos graxos poli-insaturados e fornecem mais energia para oxidação.

Energeticamente, portanto, há muito pouco sentido na produção e acumulação de TAGs ricos em ácidos graxos poli-insaturados. Talvez por isso, a cepa Rincão, crescida e analisada em fase exponencial, teve menor teor de EPA do que a cepa Navegantes, analisada em fase estacionária.

Em condições ótimas de cultivo, as microalgas sintetizam principalmente ácidos graxos de membrana (polares) formados principalmente por ácidos graxos polinsaturados (THOMPSON JUNIOR, 1996). Mas, em situações desfavoráveis ao crescimento, as microalgas sintetizam ácidos graxos de reserva (apolares); a deficiência de nutrientes leva ao decréscimo nas taxas de crescimento, algumas espécies ainda continuam a sintetizar ácidos graxos, e a sua não utilização na formação de lipídeos de membrana levaria ao acúmulo de lipídeos de reserva (triacilglicerídeos) (GUSCHINA & HARWOOD, 2009).

O teor de lipídeos, assim como os tipos de lipídeos, pode ser alterado de acordo com alterações do meio de cultivo. RODOLFI e colaboradores (2009) cultivaram *Nannochloropsis sp.* em um meio de cultura limitado em nitrogênio; depois de alguns dias verificaram que houve um incremento de ácidos graxos saturados (mirístico, palmítico, palmitoleico e oleico). Um estudo realizado com a mesma microalga testou o efeito da salinidade, intensidade de luz e disponibilidade de nitrogênio, e também concluiu o aumento de ácidos graxos, palmítico e oleico em condições limitantes em nitrogênio; por outro lado, em condições ricas em nitrogênio houve um aumento dos ácidos graxos poli-insaturados (linoleico, araquidônico e eicosapentanoico – EPA) (PAL *et al.*, 2011). Para *Scenedesmus rubescens* a limitação de nutrientes com o passar do tempo de cultivo aumentou a acumulação de ácido oleico (16% - 54%) e diminuiu os ácidos linoleico e linolênico (TAN; LIN, 2011).

O aumento da intensidade luminosa aumenta o metabolismo microalgal, favorecendo o crescimento em biomassa contendo ácidos graxos saturados e monoinsaturados; assim como o fósforo tem efeito

similar ao nitrogênio, a limitação de fósforo no meio de cultivo aumenta o teor de lipídeos de 13,2% a 50,1%, composto principalmente por triglicerídeos (RODOLFI et al., 2009).

Cultivos realizados com a adição de CO₂ tendem a aumentar a acumulação de EPA (HOSHIDA et al., 2005). Um estudo realizado com *Nannochloropsis oceanica* verificou que o meio de cultura influencia no teor de EPA produzido, a alimentação do cultivo com uma fonte de nitrogênio (NaNO₃) duplicou o teor de EPA, da mesma forma as culturas iluminadas com LED vermelho aumentaram o teor de EPA de 2,38% para 5,5%, enquanto que nas culturas iluminadas com LED azul houve um aumento de 5,0% do teor de EPA (CHEN et al., 2010).

Os ácidos graxos ideais para a produção de biocombustíveis, são os ácidos graxos saturados, que permitem diminuir as emissões tóxicas e melhora as propriedades dos biocombustíveis (número de cetanos, estabilidade oxidativa), sem comprometer as características do fluido, viscosidade e lubrificidade (KNOTHE, 2005; KNOTHE, 2008; CHISTI, 2007).

A variação do teor de lipídeos também pode estar relacionada com as diferenças genômicas entre as células. KACZMARSKA e colaboradores (2013) realizaram um estudo genômico de isolados de *A. glacialis* dos oceanos Atlântico e Pacífico e encontraram cinco grupos geneticamente distintos, dos quais quatro são novos à ciência. Entretanto, devido ao fato de o sistema internacional de unidades determinar que o nível de diferenciação molecular deva ser de 2% para que seja considerada a existência de uma nova espécie, este estudo não resultou na descrição de novas espécies, e sim na afirmação da ocorrência de espécies crípticas. Portanto, pode ser que essas espécies tenham metabolismos diferentes e produzam diferentes teores e tipos de lipídeos. Algo similar pode explicar as diferenças acima apontadas entre as cepas Rincão e Navegantes.

Outro fator a ser considerado quanto à composição de ácidos graxos saturados e ácidos graxos poli-insaturados de *A. glacialis* são as vias metabólicas pelas quais esses ácidos graxos são produzidos. A síntese de lipídeos em microalgas depende da presença de enzimas dessaturases (que promovem a adição de ligações duplas) e elongases (promovem a adição de dois átomos de carbono) (SAYANOVA; NAPIER, 2004). Há diversas rotas biossintéticas de ácidos graxos poli-insaturados, as quais podem ser por via convencional, linear ou Sprecher (PEREIRA et al., 2003). Entretanto a base ocorre com a dessaturação do ácido linoleico em ácido estearidônico, este, no entanto sofre elongação

gerando ácido eicosatetraenoico, seguido por um dessaturação gerando EPA. Nesse ponto pode haver dessaturação do EPA gerando DHA ou alongação do EPA gerando ácido docosapentaenóico e deste há a geração de ácido tetrapentaenóico, o qual é dessaturado gerando DHA (PEREIRA et al., 2003).

Alguns estudos sugerem a existência de diferentes enzimas alongases, as quais são específicas à alongação de determinados ácidos graxos, portanto possivelmente alguma dessas enzimas seja específica para a formação de DHA e EPA. A inexpressão dessas enzimas pode influenciar, portanto, na biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados (AGABA *et al.*, 2004). Complexos alongases compreendem quatro atividades: a sintase β -cetoacil-CoA, a redutase cetoacil-CoA, a desidratase hidroxilacil-CoA, e a redutase enoil-CoA. Destes, a primeira enzima é considerada limitante da velocidade e controla a especificidade em relação ao comprimento da cadeia e do padrão de ligações duplas.

MEYER e colaboradores (2004) verificaram a expressão de alongases no alongamento de cadeias de ácidos graxos para a formação de EPA e DHA. Sete alongases foram clonadas de diversos organismos (algas, peixes, rãs, ascídia, fungos) e aplicaram-se essas expressões gênicas em leveduras. Foram identificados dois tipos de alongases das algas *Ostreococcus tauri* e *Thalassiosira pseudonana*, respectivamente OtELO1 e OtELO2, TpELO1 e TpELO2, uma específica para o alongamento de C18 e outra específica para C20 (mostrando haver uma maior afinidade por EPA). As sete alongases puderam ser separadas em três grupos diferentes:

- Δ 6-C18 (TpELO1 e OtELO1),
- Δ 5-C20 (TpELO2 e OtELO2),
- Enzimas bifuncionais (OmELO, XiELO, e CiELO).

Na aplicação das enzimas TpELO1 e OtELO1, o ácido estearidônico C18:4 ω -3 (STA) foi eficientemente convertido para C20: 4 ω -3, mas não houve síntese de EPA. Entretanto quando OtELO2 e TpELO2 foram aplicados houve a síntese de EPA, o qual posteriormente foi alongado para DHA. Quando OmELO, XiELO e CiELO foram testados, o STA foi alongado sucessivamente para C20: 4 ω 3 e C22: 4 ω 3, enquanto EPA foi alongado para DHA. Sugeriu-se, assim, que diferentes organismos produzem diferentes tipos de enzimas alongases, e algumas dessas enzimas são específicas ou não à síntese de EPA e DHA.

Sabe-se também que locais com altas densidades de *A. glacialis* atraem diversos organismos que utilizam essa microalga como principal

fonte de alimento, sendo eles invertebrados bentônicos, crustáceos e peixes, como a tainha (*Mugil sp.*), que ingerem essas diatomáceas aderidas aos sedimentos na zona de arrebentação (SEELIGER, 2004). Alguns estudos encontraram 15 ácidos graxos em Tainhas (*Mugil sp.*) sendo os principais: oleico (6,27%), linoleico (6,28%), alfa-linolênico (5,61%), eicosapentanoico - EPA (5,42%) e docosahexaenoico - DHA (5,05%). A somatória do EPA e DHA foi de 10,47% (MENEZES et al., 2008). Outro estudo realizado em 2011 verificou a presença de ácidos graxos saturados e polinsaturados em tainhas (*Mugil sp.*), sendo que 23,5% destes eram da classe ômega-3 (LEMKE et al., 2011). Esses estudos que analisaram a composição lipídica da carne da tainha (*Mugil sp.*), que utiliza *A. glacialis* como principal fonte de alimentação, sugerem a ideia de que *A. glacialis* é uma ótima fonte de EPA.

As cepas de *Asterionellopsis glacialis* apresentaram diferentes teores de ácidos graxos e diferentes composições. Apesar de estas diferenças serem pequenas, pode-se concluir que o meio de cultura pode alterar a produção e o perfil de ácidos graxos produzidos pela diatomácea. Da mesma forma, o tempo de cultivo pode influenciar no perfil e na quantificação dos ácidos graxos. Este trabalho sugere que os teores de ácidos graxos poli-insaturados podem ser maiores durante a fase estacionária do cultivo, enquanto que, durante a fase exponencial, possivelmente seja maior a produção de ácidos graxos saturados.

7. CONCLUSÕES

- A composição do meio de cultivo promove alterações morfológicas em *Asterionellopsis glacialis*, em que o meio IMR com maior [Si] apresentou menor alteração.
- Apesar das indicações de trabalhos anteriores, as cepas aqui estudadas não mostraram atividade biológica contra micro-organismos. Ao contrário, houve um estímulo à bioluminescência de *Vibrio fisheri*. Entretanto, houve uma leve inibição ao crescimento da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*.
- Antes de descartar a ausência de atividade biológica dos exsudatos, porém, seria importante trabalhar com as concentrações desses exsudatos.
- *Asterionellopsis glacialis* é produtora de ácidos graxos saturados e poli-insaturados, mas a origem da cepa e a composição do meio podem influenciar no teor e perfil qualitativo de ácidos graxos. Em função disso, é fundamental detalhar essas relações.

REFERÊNCIAS

- AARONSON, Shirley. The synthesis of extracellular macromolecules and membranes by a population of the phytoflagellatê *Ochromonas danica*. **Limnology and Oceanography**. v.16, p. 1-9. 1971.
- AARONSON, Shirley; DUBINSKY, Zvy. Mass production of microalgae. **Experientia**. v. 38, p. 36-39, 1982.
- AGABA, Morris; TOCHER, Douglas R.; DICKSON, Cathryn A.; DICK, James R.; TEALEET, Alan J. Zebrafish cDNA Encoding Multifunctional Fatty Acids Elongase Involved in Production of Eicosapentaenoic (20:5n-3) and Docosahexaenoic (22:6n-3) Acids. **Marine Biotechnology**. v. 6, p. 251–261, 2004.
- AGUIAR, L.W. ; CORTE-REAL, M. Sobre uma floração de *Asterionella japonica* Cleve (1878) na costa do Rio Grande do Sul. Iheringia, Série **Botânica**. v. 17, p. 18-27, 1973.
- ABREU, Paulo C. Coastal and marine environments and their biota bacterioplankton. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (eds) Subtropical convergence environments: the coast and sea in the southwestern Atlantic. Springer- Verlag, Berlin, p. 104–105, 1997.
- ABREU, Paulo C.; RORIG, Leonardo R.; GARCIA, Virginia; ODEBRECHT, Clarisse; BOPAIHAH, Biddanda. Decoupling between bactéria and the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* at Cassino Beach, Brazil. **Aquatic microbial ecology**. v. 32, p. 219–228, 2003.
- ALGAEBASE. Publicação eletrônica mundial, National University of Ireland, Galway. Disponível em : <<http://www.algaebase.org>>; acesso em 12 de agosto de 2014.
- ALONSO, Diego Lopez; BELARBI, El-Hassan; FERNANDEZ-SEVILLA, Jose M; RODRIGUEZ-RUIZ, Juan; MOLINA GRIMA, Emilio. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytochemistry**. v. 54, n. 5, p. 461-471, 2000.

AUBERT, M.; PESANDO, D.; GAUTHIER, M. Phenomenes d'antibiosi d'origine phytoplantonique en milieu marin. **Rev Int Océanogr Méd.** v. 18, n. 19, p. 69–76, 1970.

AZAM, F. et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology-Progress Series.** v. 10, n. 3, p. 257, 1983.

BARSANTI, Laura; GUALTIERI, Paolo. **Algae- Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.** (Ed. 8) Taylor e Francis Group. London, England. p. 209-249, 2014.

BARCELOS E RAMOS, Joana; SCHULZ, Kai Georg; BROWNLEE, Colin; SETT, Scarlett; AZEVEDO, Eduardo Brito. **Effects of Increasing Seawater Carbon Dioxide Concentrations on Chain Formation of the Diatom *Asterionellopsis glacialis*.** 2014.

BAYSSE, C.; ELGUE, J. C.; BURONE, F. Variaciones en la distribucion y relaciones interespecificas del fitoplankton en una playa arenosa de la costa Atlantica Uruguaya. **Frente Maritima.** p. 95-114, 1989.

BEARDALL, Jonh; ROBERTS, Simon; MILLHOUSE, Jenny. Effects of nitrogen limitation on uptake of inorganic carbon and specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in green microalgae. **Canadian Journal Botany.** v. 69, p. 1146–1150, 1991.

BECKER, Wolfgang. Microalgae in human and animal nutrition. *In:* RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: BlackwellScience. p. 312-351, 2004.

BEHRENS, Paul W.; KYLE, David J. Microalgae as a source of fatty acids. **Jornal of food lipids.** v. 3, 1996. 259 p.

BERGES, Jonh A.; FRANKLIN, Daniel J.; HARRISON, Paul J. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. **Journal of Phycology.** v. 37, p. 1138–1145, 2001.

BROWN, Alec ; MCLACHLAN, Anton. **Ecology of sandy shores.** Elsevier, Amsterdam. 2006. 328 p.

CAMPENII, L. et al. Carotenoid and lipid production by autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity and luminosity stress conditions. **Bioenergy and biofuels**. v.97, p. 1383-1393. 2012.

CAMPBELL, Eillen E. The global distribution of surf diatom accumulations: Distribucion global de acumulaciones de diatomeas en la zona de rompiente de Las olas. **Revista Chilena de Historia Natural**. v. 69, p. 495-501, 1996.

CAMPBELL, Eillen E.; BATE, G.C. Coastal features associated with diatom discoloration of surf-zones. **Botanica Marina**. v. 40, p. 179-185, 1997.

CERON GARCÍA, M. C. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**. v. 12, p. 239-248, 2000.

CHAN, A. T.; ANDERSEN, R. J.; LE BLANC, M. J.; HARRISON, P. J. Algal plating as a tool for investigating allelopathy among marine microalgae. **Marine Biology**. v. 59, p. 7-13, 1980.

CHEN, Chun-Yen; CHEN, Yu-Chun; HUANG, Hsiao-Chen; HUANG, Chieh-Chen; LEE, Wen-Lung; CHANG, Jo-Shu. Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2. **Bioresource Technology**. v. 147, p. 160-167, 2010.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. p. 294-306, 2007.

CHOJNACKA, Katarzyna; MARQUEZ-ROCHA, Facundo-Joaquin. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

CLSI/NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- Approved Standard**. Wayne: Pennsylvania, 2002.

COHEN, Zvi; KHOZIN-GOLDBERG, Inna. Searching for PUFA-rich microalgae. *In*: COHEN, Z. ; RATLEDGE, C. (editors.). Single Cell Oils. American Oil Chemists' Society, Champaign IL. p. 201–224, 2010.

COLE, Jonathan J. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 13, n. 1, p. 291-314, 1982.

COLLA, Luciane M.; AUGUSTO-RUIZ, Walter; COSTA, Jorge A. V. **Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas**. v. 12, p. 61 – 78, 2002.

COSTA, Jorge A. V.; RADMANN, Elisangela M.; CERQUEIRA, Vanessa S.; DOS SANTOS, Glória C.; CALHEIROS, Maurício N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e nutrição Araraquara**. v. 17, n. 4, p. 429-436. 2006.

COX, Eillen J. Morphology, cell wall, cutology, ultrastructure and morphogenetic studies: overview and specific observation. *In*: SECKBACH, J.; KOCIOLEK, J. P. The diatom world: cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology, 2011. 11 p.

CURI, Rui; MIYASAKA, Célio K. ; POMPÉIA, Celine; PROCOPIO, Joaquim. **Entendendo a gordura – os ácidos graxos**. São Paulo, Editora Manole, 2002. 598 p.

DE CAMPOS, Fábio G. C. M.; HABR-GAMA, Angelita; PLOPPER, Caio; TERRA, Ricardo M.; WAITZBERG, Dan L.; Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais. **Rev. bras. Coloproct.** v. 19, n. 1, p. 11-16, 1999.

D'ELIA, Chris. F., GUILLARD, Robert R. L., NELSON, Dan M. Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. I. Nutrient effects. **Marine Biology**. v. 50, p. 305-312, 1979.

DEMIRBAS, Ayhan. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**. v. 88, p. 3541–3547. 2011.

DERNER, Roberto B.; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício;
DE CARVALHO, Sabrina Matos; FETT, Roseane. **Microalgas,
produtos e aplicações**. Ciência Rural. v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DUPREEZ, Derek R.; CAMPBELL, Elisabeth E.; BATE, G.C. First recorded bloom of the diatom *Asterionella glacialis* Castracane in the surf-zone of the Sundays River beach. South Africa. **Botanica Marina**. v. 32, n. 6, p. 503-504. 1990.

EPPLEY, Richard W. The growth and culture of diatoms. *In*:
WERNER, D. The biology of diatom. V. 13, 1977.

FIELD, Christopher B.; BEHRENFELD, Michael J.; RANDERSON,
James T.; FALKOWSKI, P. Primary production of biosphere:
Integrating terrestrial and oceanic components. **Science**. p. 281, 1998.

GARCÍA, Norma; LÓPEZ-ELÍAS, José Antonio; MIRANDA,
Anselmo; MARTÍNEZ-PORCHAS, Marcel; HUERTA, Nolberta;
GARCÍA, Antonio. Effect of salinity on growth and chemical
composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture
phases. **Lat. Am. J. Aquat. Res.** v. 40, n. 2, p. 435 - 440, 2012.

GAYOSO, Ana M.; MUGLIA, Vicente H. Blooms of the surfzone
diatom *Gonioceros armatus* (Bacillariophyceae) on the south Atlantic
coast (Argentina). **Diatom Research**. V. 6, p. 247-253, 1991.

GIANUCA, N. M. A preliminary account of the ecology of sandy
beaches in southern Brazil. *In*: MCLACHLAN, A.; ERASMUS, T.
(Eds.) Sandy beaches as ecosystems. p. 413- 419. Dr. Junk Publishers,
The Hague. 1983.

GUILLARD, Richard R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine
invertebrates. *In*: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). Plenum
Press, New York, USA. p. 26-60, 1975.

GUSCHINA, Irina A.; HARWOOD, John L. Algal lipids and effect of
the environment on their biochemistry. *In*: ARTS, M. T.; BRETT, M.
T.; KAINZ, M. J. (eds) Lipids in aquatic ecosystems. Springer New
York. p. 1-24, 2009.

GRAZIOLA, Fabiana; SOLIS, Victor S.; CURI, Rui. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. *In*: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. Entendendo as gorduras – os ácidos graxos. Malone. 2002.

GRAHAM, James M.; GRAHAM, Linda E.; ZULKIFLY, Shahrizim B.; PFLEGER, Brian F.; HOOVER, Spencer W.; YOSHITANI, Jun. Freshwater diatoms as a source of lipids for biofuels. **J. Ind. Microbiology Biotechnol.** V. 39, n. 3, p. 419 - 28, 2012.

GILL, Iqbal; VALIVETY, Rao. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology.** v. 15, p. 401-409, 1997.

GRIMA, M. E.; CAMACHO, F. G.; FERNÁNDEZ, A. F. G. Production of EPA from *Phaeodactylum tricornutum*. *In*: COHEN, Z. Chemical from microalgae. Ed. Taylor Francis. p. 57-87, 1999.

GONSALVES, Paulo E. **Livro dos alimentos.** 2002.

HARRIS, Graham P. Photosynthesis, productivity, and growth: the physiological ecology of phytoplankton. **Archiv for Hydrobiologie.** v. 10, p. 1-171, 1978.

HALLEGRAEFF, Gustaaf M.; ANDERSON, Donald M.; CEMBELLA, Alla D. **Manual on Harmful Marine Microalgae.** UNESCO. Paris. p. 794. 2003.

HALLEGRAEFF, Gustaaf M. Harmful algal blooms: a global overview. *In*: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A.D. (Eds), Manual on Harmful Marine Microalgae, UNESCO. Paris. p. 794. 2003.

HARTMAN, Leopold; LAGO, Regina C. A. **Rapid Preparation of Fatty Acids Methyl Esters From Lipids.** Lab. Pract. 22: 457-477. 1973.

HOSHIDA, Hisashi; OHIRA, Takayuki; MINEMATSU, Akira; AKADA, Rinji; NISHIZAWA Yoshinori. Accumulation of eicosapentanoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated

CO₂ concentrations. **Journal Application Phycology**. v. 17, n. 1, p. 29-34. 2005.

HU, Qiang. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science. p. 264-272. 2004.

HUANG, GuanHua; CHEN, Feng; WEI, Dong; ZHANG, XueWu; CHEN, Gu. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied energy. v. 87, p. 38-46. 2010.

IGNATIDES, L. ; FOGG, G. E. Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleave in field conditions. **Marine Biology**. v. 53, p. 923-935. 1973.

ISO 11348-2. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 1: Method using freshly prepared bacteria. 1998.

JIANG, Yuelu; LAVERTY, Katherine S.; BROWN, Jola; NUNEZ, Marcella; BROWN, Lou; CHAGOYA, Jennifer; BUROW, Mark; QUIGG, Antonietta. Effects of fluctuating temperature and silicate supply on the growth, biochemical composition and lipid accumulation of *Nitzschia* sp. **Bioresource Technology**. v. 154, p. 336-344. 2014.

JUSTIC, Dubravko; RABALAIS Nancy N.; TURNER, Eugene R. Stoichiometric Nutrient Balance and Origin of Coastal Eutrophication. **Marine Pollution Bulletin**. v. 30, n. 1, p. 41-46. 1995.

KACZMARSKA, Irena; MATHER, Laura; LUDDINGTON, Ian A.; MUISE, France; EHRMAN, James M. Cryptic diversity in a cosmopolitan diatom known as *Asterionellopsis glacialis* (Fragilariaceae): Implications for ecology, biogeography, and taxonomy. **American Journal of Botany**. p. 101. 2014.

KAIN, Joanna M.; FOGG, G. E. Studies on the growth of marine phytoplankton II. *Isochrysis galbana* Parke. **Journal Mar. Biology Ass. U. K.** v. 37, p. 781-788. 1958.

KYLE, D. J.; OHAD, Iu. The mechanism of photoinhibition of higher plants and green algae. *In: Encyclopedia of plant physiology. New series. v. 19. Photosynthesis (Ed.) STACHELIN, L. A. Springer-Verlag, Berlin. p. 468-475. 1986.*

KRABERG, Alexandra; BAUMANN, Marcus; DURSELEN, Claus-Dieter. **Coastal Phytoplankton: Photo Guide for Northern European Seas.** Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Munchen, Germany. p. 204. 2010.

KOOISTRA, Wiebe H. C. F.; GERSONDE, Rainer; MEDLIN, Linda K, MANN, David G. The origin and devolution of the diatoms: their adaptation to a planktonic existence. *In: Evolution of primary producers in the sea. (Eds) FALKOWSKI, Paul G.; KNOLL, Andrew H. 2007.*

KÖRNER, Heinz. Morphologie und Taxonomie der Diatomeengattung *Asterionella*. **Nova Hedwigia.** v. 20, p. 557-724. 1970.

KNOTHE, Gerhard. **Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters.** Fuel Process. Technology. v. 86, n. 10, p. 1059-1070. 2005.

KNOTHE, Gerhard. **“Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties.** Energy Fuels. v. 22, n. 2, p. 1358-1364. 2008.

KHOZIN-GOLBERG, Inna ; COHEN, Zvi. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water Eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Pytochemistry.** v. 67, p. 696-701. 2006.

LAVÍN, Paris L.; LOURENÇO, Sergio O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures. **Brazilian Journal of Oceanography.** v. 53, n. 1, p. 55-67. 2005.

LEE, Cindy ; BADA, Jeffrey L. Amino acids in equatorial Pacific Ocean water. **Earth and Planetary Science Letters.** 1975.

LEE, Ho-Sang; SEO, Mun-Won; KIM, Z-Hun; LEE, Choul-Gyul. Determining the best specific light uptake rates for the lumostatic

cultures in bubble column photobioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 447-452. 2006.

LEE, Robert E. **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008.

LEE, Joon-Baek; KIM, Bo-Young. Growth characteristics of five microalgal species isolated from Jeju Island and four microalgal stock strains in hatchery. *Algae*. v. 17, p. 17-125. 2002.

LEMAN, John. Oleaginous microorganisms: An assessment of the potential. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 43, p. 195–243. 1997.

LEMKE, Stella; CASTRO, Gabriela S. F.; FACCIN, Gerson L.; JORDÃO-JUNIOR, Alceu A.; VANNUCCHI, Helio; TRAMONTE, Vera L. C. G. Perfil de ácidos graxos de tainhas (*Mugil Platanus*) da região sul do Brasil. **Nutrire**. v. 36, p. 344-344. 2011.

LEWIN, Joyce C. Silicon metabolism in diatom: Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. **Phycologia**. v. 6, p. 1-12. 1966.

LEWIN, Joyce. Metabolism in Diatoms. V- Germanium Dioxide, a Specific Inhibitor of Diatom growth . *Phycologia*. v. 6, n. 1, p. 1-12. 1966.

LIMA, Flávia E. L.; MENEZES, Tarciana N.; TAVARES, Miriam P.; SZARFAC, Sophia C.; FISBERG, Regina M. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Ver. Nutri., Campinas*. v. 13, n. 2, p. 73-80. 2000.

LIU, Zhi; WANG, Guang-Ce.; ZHOU, Bai-Cheng. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 4717–4722. 2008.

LOURENÇO, Sergio O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA. 2006.

MAYZAUD, Patrick; CHANUT, John P.; ACKMAN, Robert G. Seasonal changes of the biochemical composition of marine particulate

matter with special reference to fatty acids and sterols. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 56, p. 189–204. 1989.

MANN, David G. Why didn't Lund see sex in *Asterionella*? A discussion of the diatom life cycle in nature. Biopress. 1988.

MATA, Teresa M.; MARTINS, Antonio A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, n. 14, p.217-232, 2010.

MCLACHLAN, Anton ; HESP, Patrick. **Surf zone diatom accumulations on the Australian coast**. *Search*. v. 15, p. 7-8. 1984.

MENEZES, Maria E. S.; LIRA, Giselda. M.; OMENA, Cristhiane M. B.; FREITAS, Johnnatan D.; SANT'ANA, Antônio E. G. Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da Lagoa Mundaú, AL/Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. v. 67, n. 2, p. 89-95. 2008.

MEYER, Astrid; KIRSCH, Helena; DOMERGUE, Frédec; ABBADI, Amine; SPERLING, Petra; BAUER, Jörg; CIRPUS, Petra; ZANK, Thomas K.; MOREAU, Hervé; ROSCOE, Thomas J.; ZÄHRINGER, Ulrich; HEINZ, Ernest. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. **Journal of lipid research**. v. 45, p. 1899-1909. 2004.

MOLINA-GRIMA, Emilio; PÉREZ, Serio; GÁRCIA CAMACHO, José A.; GARCÍA SÁNCHEZ, José L.; FERNÁNDEZ SEVILLA, José M. Variation of fatty acid profile with solar cycle in outdoor chemostat culture of *Isochrysis galbana* ALII-4, J. **Appl. Phycol.** 7, 129-134. 1995.

MORRIS, R.J. ; MCCARTNEY, M. J. Studies of a spring phytoplankton bloom in an enclosed experimental ecosystem. 1. Biogeochemical changes in relation to the nutrient chemistry of water. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 70: 249-262. 1983.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Lehninger - Princípios de bioquímica**. 3.ª ed. São Paulo: Sarvier Editora Ltda, 955. 2002.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger - Princípios de bioquímica**. 5.ª ed. Porto Alegre, Editora Artmed, 1304. 2011.

ODEBRECHT, Clarisse; SEGATTO A. Z. ; FREITAS C. A. Surf-zone Chlorophyll *a* Variability at Cassino Beach, Southern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 41: 81–90. 1995.

ODEBRECHT, Clarisse; BERGESCH, Marli; RÖRIG, Leonardo R.; ABREU, Paulo C. Phytoplankton Interannual Variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-2007), with Emphasis on the Surf Zone Diatom *Asterionellopsis glacialis*. **Estuaries and coasts**. 33: 570-583. 2010.

OLIVEIRA, Henriette R.; GAZZOLA, Jussara. Digestão dos trigliceróis. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Ed. Malone. 2002.

OLIVEIRA, José C. S. ; DIAS, Ivelton J. M.; CÂMARA, Claudio A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punivifolia* (HBK) DC. De diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia** . v. 15, n. 1, p.31-43. 2005.

PAL, Dispalmita; KHOZIN-GOLDBERG, Inna; COHEN, Zvi; BOUSSIBA, Sammy. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. **Appl Microbiol Biotechnol**. 90(4):1429-1441. 2011.

PARSONS, Timothy R.; MAITA, Yoshiaki; LALLI, Carol M. **A manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis**. Oxford, Pergamon Press. 173. 1984.

PÉREZ, Helen E. B. **Biodiesel de microalgas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN**. São Paulo. Energia Verde – Biodiesel, MDL e Tecnologia em Microalgas. Curitiba. 2007.

PEREIRA, Suzette L.; LEONARD, Amanda E.; MUKERJI, Pradip **Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animal and lower eukaryotes**. Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids 68:97-106. 2003.

POHL, P., ZURHEIDE, F. Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. *In: Hoppe, H.A., Levring, T., Tanaka, Y. (Eds.), Marine Algae in Pharmaceutical Science.* Walter de Gruyter, Berlin, p. 473–523. 1979.

PRINCE, Emili K.; MYERS, Tracey L.; NAAR, Jerome; KUBANEK, Julia. Competing phytoplankton undermines allelopathy of a blomm-forming dinoflagellate. **Proceedings of the Royal Society.** v. 275, p. 2733-2741. 2008.

PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 65, n. 6, p. 635-648. 2004.

POMPÉIA, Celine. Essencialidade dos ácidos graxos. *In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura – os ácidos graxos.* São Paulo, Editora Manole. p. 598. 2002.

RADMANN, Elisangela M.; COSTA, Jorge A. C. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos fases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova.** v. 31, n. 7, p. 1609-1612. 2008.

RAPSON, Adam M. Feeding and control toheroa (*Amphidesma ventricosum* Gray) (Eularnellibranchiata) populations in New Zealand. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research.* v. 5, p. 486-512. 1954.

RAPOSO, Helena F. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. **Rev. Nutr., Campinas.** v. 23, n. 5, p. 871-879. 2010.

RENAUD, Susan M.; THINH, Luong-Van.; LAMBRINIDIS, George.; PARRY, David L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture.** v. 211, p. 195–214. 2002.

REITAN, Kjell I.; RAINUZZO, Jose R. OLSEN, Yngvar. Effect of nutriente limitation of fatty acid and lipid contente of marine microalgae. *Journal Phycology.* v. 30, p. 972-979. 1994.

REVIERS, Bruno. **Biologia e filogenia das algas**. Paris. 2003.

RIBEIRO, Carlos. P. **Reuso de CO₂ e Vinhoto Emitidos na Indústria de Bioetanol para Produção de Biocombustíveis e AGPI**. Projeto Final de Curso. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. p. 82. 2012.

RICHMOND, Aмос. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science. 2004.

RIQUELME, Carlos E.; FUKAMI, Kimio; ISHIDA, Yusaburo. Growth response of bacteria to extracellular products of bloom algae. **Nippon Suisan Gakkaishi**. v. 55, n. 2, p. 349-355. 1989.

RIQUELME, Carlos E.; FUKAMI, Kimio; ISHIDA, Yusaburo. Effects of Bacteria on the Growth of a Marine Diatom, *Asterionella glacialis*. **Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology**. v. 3, n. 1, p. 29-34. 1988.

RIQUELME, Carlos E.; ISHIDA, Yusaburo. Chemotaxis of bacteria of extracellular products of marine bloom algae. **Journal Gen. Appl. Microbiol.** v. 34, p. 417-423. 1988.

RODOLFI, Liliana; ZITTELLI, Graziella C.; BASSI, Niccolò; PADOVANI, Giulia; BIONDI, Natascia; BONINI, Gimena; TREDICI, Mario R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**. v. 102, n. 1, p. 100-112. 2009.

ROBLES-MEDINA, Afonso; GÍMÉNEZ-GIMÉNEZ, A.; IBÁÑEZ-GONZÁLEZ, José M. Downprocessing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**. v. 16, n. 13, p. 517-580. 1998.

ROCHA, Jorge M. S.; GARCIA, Juan E. C.; HENRIQUES, Marta H. F. Growth aspects of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**. v. 20, p. 237-242. 2003.

RÖRIG, Leonardo R. **Acumulações da diatomácea *Asterionellopsis glacialis* e sua relação com variáveis ambientais na Praia do**

Cassino, Rio Grande. MSc thesis, Federal University of Rio Grande. 1997.

RÖRIG, Leonardo R. ; GARCIA, Virgínia M. T. Accumulations of the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* (CASTRACANE) ROUND in Cassino Beach, Southern Brazil, and its relationship with environmental factors. **Journal of Coastal Research.** v. 35, p. 167–177. 2003.

RÖRIG , Leonardo R.; DE ALMEIDA Tito C. M.; GARCIA, Virginia M. T. Structure and succession of the surf-zone phytoplankton in Cassino Beach, southern Brazil. **Journal of Coastal Research.** v. 39, p. 1246 – 1250. 2004.

RÖRIG, Leonardo R.; DE ALMEIDA, Tito C. M.; GARCIA, Virgínia M. T. Structure and succession of the surf-zone phytoplankton in Cassino beach, Southern Brazil. **Journal of coastal research.** p. 1246-1250. 2006.

RÖRIG, Leonardo R.; RESGALLA Charrid J. R.; PEZZUTO, Paulo R.; ALVES, Eliana; MORELLI, Fabiano. (1997). Análise ecológica de um processo de acumulação da diatomácea *Anaulus* sp. na zona de arrebenção da praia de Navegantes (Santa Catarina, Brasil). **Oecologia Brasiliensis.** v. 3, p. 29 – 43. 1997.

SAYANOVA, Olga V.; NAPIER, Johnathan A. Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. **Fitoquímica.** v. 65, n. 2, p. 147-158. 2004.

SAYEGH, Fotoon A.; MONTAGNES, David J. S. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition". **Bioresour Technol.** v. 102, n. 3, p. 3007-3013. 2011.

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei D.; COLLA, Luciane M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATÉC – UPF.** v. 4, n. 10, p. 48-60. 2012.

SEELIGER, Ulrich. **Areias do Albardão: um guia ecológico ilustrado do litoral no extremo sul do Brasil.** (Eds) SEELIGER, Ulrich; CORDAZZO, César; BARCELLOS, Lauro. Rio Grande: Ecoscientia. 2004.

SHARP, Jonatan H.; UNDERHILL, Peter A.; HUGHES, David J. Interaction (Allelopathy) between marine diatoms - *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Phycology**. v. 15, n. 4, p. 353-362. 1979.

SHEEHAN, John; DUNAHAY, Terri; BENEMANN, Jonh; ROESSLER, Paul A. **U.S. Department of Energy's, Office of Fuels Development**, p. 328. 1998.

SIMOPOULOS, Artemis P. Ômega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **American Journal Clinical Nutrition** v. 54, p. 438-463. 1991.

SIRON, Robert; GIUSTI, Gérard; BERLAND, Brigitte. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency, **Marine Ecology Progress series**. v. 55, p. 95-100. 1989.

SLOFF, D. S.; MCLACHLAN, A.; BATÉ, G. C. Spatial distribution and diel periodicity of *Anaulus birostratus* Grunow in the surf zone of a sandy beach in Algoa Bay, South Africa. **Botanica Marina**. v. 27, p. 461-465. 1984.

SPOLAORE, Pauline; JOANNIS-CASSAN, Claire; ISAMBERT, Arséne; DURAN, Elie.. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 101, n. 2, p. 87-96. 2006.

SOARBIERI, Valdomiro C.; PACHECO, Maria T. B. Revisão: alimentos funcionais fisiologicos. **Brazilian Journal of food technology**. v. 2, n. 12, p. 7-19. 1998.

SONDERGAARD, Morten ; SCHIERUP, Hans- Henrik. Release of extracelular organic carbon during a diatom bloom in Lake Mosso: molecular weight fractionation. **Freshwat. Biol.** v. 12, p. 313-320. 1982.

SHIMIZU, Yuzuru. Microalgal metabolites. **Chemical Rev.** p. 1685-1698. 1993.

SUALI Emma; SARBATLY, Rosalam. **Conversion of microalgae to biofuel. Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 16, p. 4316–4342. 2012.

SUNESÉN, Inés; EUGENIA, Sar, A. Diatomeas marinas de aguas costeras de la provincia de Buenos Aires (Argentina). III Géneros potencialmente nocivos *Asterionellopsis glacialis*, *Cerataulina*, *Ceratoneis* y *Leptocylindrus*. **Revista Chilena de Historia Natural.** v. 80, p. 493-507. 2004.

SUKENIK, Assaf; ZMORA, Odi; CARMELI, Yael. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II, *Nannochloropsis* sp., **Aquaculture.** v. 117, p.313-326. 1993.

SUKENIK, Assaf. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentanoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). **Bioresource Technol.** v. 35, n. 3, p. 263-269. 1991.

SUKENIK, Assaf. **Production of eicosapentanoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*.** In: COHEN, Zvi. Chemical from microalgae. Ed. Taylor Francis. p. 41-53. 1999.

TALBOT, M. M. B. & BATÉ, G. C. Distribution patterns of rip frequency and intensity in Algoa Bay, South Africa. **Marine Geology.** V. 76, p. 319-324. 1987.

TALBOT, M. M. B. & BATÉ, G. C. Distribution patterns of the surf diatom *Allcwlus birostratus* in an exposed surfzone. **Estuarine Coastal and Shelf Science.** v. 26, p. 137-153. 1988.

TAN, Yixin; LIN, Junda. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. **Bioresour Technol.** v. 102, n. 21, p. 10131-10135. 2011.

THOMPSON, Peter A.; GUO, Ming-xin; HARRISON, Paul J.; WHYTE, John N. C. Effects of variation in temperature: on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology.** v. 8, n. 4, p. 488-497. 1992.

THOMPSON, Lilian U.; RICKARD, Sharon E.; ORCHESON, Lindy J.; SEIDL, Maja M. **Flaxseed and its lignan and components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis.** *Carcinogenesis*, Oxford. V. 17, p. 1373-1376. 1996.

VALENZUELA-ESPINOZA, Enrique; MILLAN-NUNEZ, Roberto; NUNEZ-CEBRERO, Filiberto. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**. 25: 207-216. 2002.

VIEIRA SOBRINHO, João P. Distribuição, abundância e alimentação dos jovens de Mugilidae no estuário da Lagoa dos Patos e movimentos reprodutivos da tainha (*Mugil platanus* Gunther, 1880) no litoral sul do Brasil. **Dissertação de mestrado**. Universidade do Rio Grande. p. 140. 1985.

VILLAC, Maria C.; NORONHA, Valéria A. The surf-zone phytoplankton of the state of São Paulo, Brazil. I. Trends in space-time distribution with emphasis on *Asterionellopsis glacialis* and *Anaulus* sp. (Bacillariophyceae). **Nova Hedwigia**, Beiheft. v. 133, p. 115-129. 2008.

VISO, Anne-Catharine; MARTY, Jean-Claude. Fatty acids from 28 marine microalgae. **Phytochemistry**. v. 34, n. 6, p. 1521-1993. 1993.

VOET, Donald; VOET, Judith. G. **Bioquímica**. Artmed. 2007.

XIN, Li; HONG-YING, Hu; KE, Gan; YING-XUE, Sun. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 14, p. 5494-5500. 2010.

ZHUKOVA, Natalia V.; AIZDAICHER, Nina V. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**. v. 39, n. 2, p. 351-356. 1995.

WEN, Zhi Y.; CHEN, Feng. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**. v. 21, p. 273 – 294. 2003.

WERNER, Dietrich. Silicate metabolismo. In: WERNER, Dietrich (ed). *The Biology of diatomáceas, botânico Monografias*, University of California Press. p. 13-498. 1977.

WERNER, Dietrich. Die Kieselsäure in stoffchsel von *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin und Guillard. *Arch Mikrobiol.* v. 55, p. 278-308. 1966.

WOLMARANS, Karien. The influence of nutrientes on surf-zone phytoplankton. **Thesis**. 2012.

YAMASAKI, Yasuhiro; SHIKATA, Tomoyuki; NUKATA, Atsushi; ICHIKI, Satoko; NAGASOE Sou; MATSUBARA. Tadashi; SHIMASAKI, Yohei; NAKAO, Miki; YAMAGUCHI, Kenichi; OSHIMA, Yuji; ODA, Tatsuya; ITO, Makoto; JENKINSON, Ian R.; ASAKAWA, Makio; HONJO, Tsuneo. Extracellular polysaccharide-protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community. **ISME Journal**. v. 3, n. 7, p. 808-817. 2009.

YAMASAKI Y.; Yasuhiro; OHMICHU, Y.; SHIKATA, Tomoyuki; HIROSE, M.; SHIMASAKI, Yohei; OSHIMA, Yuji; T. HONJO, Tsuneo. Species-specific allelopathic effects of the diatom *Skeletonema costatum*. **Thalassas**. v. 27, n. 1, p. 21-32. 2010.

YONGMANITCHAI, Wichien ; WARD, Owen P. Growth of and ômega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. **Appl. environ. Microbiol.** v. 57, p. 419-425. 1991.

Anexo A - meio de cultura f/2 (GUILLARD, 1975)

Componente	Solução estoque	Quantidade
NaNO ₃	75 g/L dH ₂ O	1 mL
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	30 g/L dH ₂ O	1 mL
Solução de metais traço		1 mL
Solução de vitaminas		0.5 mL
Metais traço	Solução estoque	Quantidade
FeCl ₃ .6H ₂ O	...	3.15g
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	...	4.36g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O	1 mL
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O	1 mL
CoCl ₂ . 6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O	1 mL
MnCl ₂ . 4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O	1 mL
Vitaminas	Solução estoque	Quantidade
Tiamina HCl (vit. B12)		200 mg
Biotina (vit. H)	0.1 g/L dH ₂ O	10mL
Cobalamina (Vit. B12)	1.0 g/L dH ₂ O	1mL

Anexo B - meio de cultura IMR (EPPLEY et al., 1967)

Pré- solução	Componentes	Quantidade (100mL)	Solução final (1.000mL água do mar)
	NaNO ₃	5,0g	0,5 ml
	KH ₂ PO ₄	0,68g	0,5 ml
	Na ₂ SiO ₃ . 9 H ₂ O	1,4g	5, 0 ml
	HCl		5,0 ml
Solução de metais + quelante	Componentes	Quantidade (100mL)	Solução final (1.000mL água do mar)
	Na ₂ EDTA	6,0g	0,5 ml
	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,0g	0,5 ml
	MnSO ₄ . H ₂ O	620 g	0,5 ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	250 g	0,5 ml
	COCl ₂ .6H ₂ O	130g	0,5 ml
	CUSO ₄ .5H ₂ O	4,0g	0,5 ml
Vitaminas	Componentes	Quantidade (100mL)	Solução final (1.000 mL água do mar)
			0,5 ml