

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO, TAXONOMIA E POTENCIALIDADES DE  
APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA DE CEPAS DE  
DIATOMÁCEAS MARINHAS DO ESTADO DA PARAÍBA

RENATA BARBOSA FELISBERTO

Orientador: Prof. Dr. Roberto Sassi

Co Orientador: Profa. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

JOÃO PESSOA- 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO, TAXONOMIA E POTENCIALIDADES DE  
APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA DE CEPAS DE  
DIATOMÁCEAS MARINHAS DO ESTADO DA PARAÍBA

RENATA BARBOSA FELISBERTO

Orientador: Prof. Dr. Roberto Sassi

Co Orientador: Profa. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

Trabalho realizado como exigência parcial  
para a obtenção de grau de Bacharelado em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
da Paraíba.

JOÃO PESSOA– 2014

RENATA BARBOSA FELISBERTO

CULTIVO, TAXONOMIA E POTENCIALIDADES DE  
APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA DE CEPAS DE  
DIATOMÁCEAS MARINHAS DO ESTADO DA PARAÍBA

Data de defesa: 21 de Agosto de 2014

Resultado: \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Roberto Sassi

(Orientador) Departamento de Sistemática e Ecologia/CCEN/UFPB – Campus I.

Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda

Departamento de Sistemática e Ecologia/CCEN/UFPB – Campus I.

Ms. Clediana Dantas Calixto

Programa de Pós Graduação em Química CCEN/UFPB – Campus I.

Ms. Katharina Kardinele Barros Sassi

Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos CT/UFPB –  
Campus I.

JOÃO PESSOA– 2014

*Dedico a todos que me fizeram e fazem seguir o caminho do bem: meus pais, irmãos, sobrinha, tios, primos e amigos — amores incondicionais!*

*“Tudo o que fizeres de bom no teu dia: o faça com amor, pois este é o teu presente e futuro!” (Maria Eugênia Barbosa Felisberto).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a todos os seres superiores que me acompanham no caminho da vida.

Aos meus pais, Agnaldo de Almeida Felisberto e Maria Eugênia Barbosa Felisberto — meus primeiros mentores—, que se dedicaram em amar e educar a mim e meus irmãos da forma mais magnífica, nos tornando pessoas unidas e do bem. A meus irmãos, Ana Paula Barbosa Felisberto e Thiago Barbosa Felisberto, por todo o apoio, carinho e ajuda. A minha graciosa sobrinha Alanna Yareth Felisberto Ibarra que, ainda não sabendo, é parte de toda essa força! Vocês são os laços mais amorosos e firmes que carrego ao meu lado.

Agradeço, imensamente, aos meus amigos. Aos doces cafés com minha irmã e amiga Michelle, às descontrações com Allyne que incansavelmente nunca deixou de perguntar: “Ei, B. Tu num vai se formar não?” (quanto a isto...bom...agora eu poderei ter uma resposta mais exata!!). Aos amigos que conquistei durante essa jornada acadêmica: a companhia, os risos, conversas, silêncio, forças e apoio. Em especial à minha grande amiga Maria Augusta (minha impetuosa “Neguinha” de todos os dias) por ter sido ímpar... Nunca esquecerei a completude que senti ao ouvir você me falar “Você tem potencial!”, em momentos difíceis e inseguros, essa frase ecoa em meus pensamentos e coração. Vocês todos foram e são essenciais em minha existência.

Ao meu orientador Dr. Roberto Sassi por me guiar, me ensinando e incentivando toda a minha vontade de busca pelo conhecimento. Aos meus amigos de laboratório que mostram todos os dias que o crescimento acadêmico se faz com a cooperação; todos nós podemos ensinar aprender e somar em conjunto. Em especial agradeço a Aline Lourenço por todo o tempo e amizade fornecido a mim, se preocupando, conversando e ajudando, você tem minha leal gratidão!

Aos colegas e educadores que estiveram presentes e contribuíram para o meu crescimento. À contribuição diária das técnicas de laboratório, que ajudam muito nossas pesquisas. A todos que contribuem em certos âmbitos para que a universidade exista — a quem devemos sempre lembrar de dar retorno que aprendemos, tanto em nossas pesquisas quanto como pessoas, pois a universidade é um espaço onde, também, crescemos pessoalmente!

Ao Dr. Roberto Antoniosi Filho do Laboratório de Métodos de Extração e Separação da Universidade Federal de Goiás e sua equipe, pelas análises cromatográficas das amostras de diatomáceas estudadas.

Ao Prof. Dr. Sandro Marden Torres e aos colaboradores do Departamento de Engenharia de Materiais pela simpatia em nos receber para fazer as fotografias em microscópio eletrônico de varredura.

Ao CNPq pela concessão de bolsa ITI-A através do projeto “Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação na Produção de Biodiesel de Óleos Derivados de Microalgas”, financiado pelo MCTI/FINEP.

E por fim, aos deliciosos momentos boêmios de filosofia com os amigos, sou eternamente grata...

Renata (Tchutchuca)!

## RESUMO

Foram estudadas espécies de diatomáceas marinhas isoladas de amostras de água das praias do Cabo Branco, Intermares e Seixas e de invertebrados benticos dos recifes do Cabo Branco, estado da Paraíba, e cultivadas em laboratório em meio sintético, visando seu estudo taxonômico e a caracterização da composição de ácidos graxos das espécies em cultivo laboratorial. As amostras coletadas foram inoculadas em meio Conway preparado com água do mar filtrada e esterilizada e mantidas em câmara de cultivo climatizada no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB). As diatomáceas isoladas foram codificadas e incluídas na Coleção de Microalgas do LARBIM/UFPB. Todas as cepas foram identificadas ao menor nível taxonômico possível com utilização de microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os ensaios laboratoriais, desenvolvidos em câmara de cultivo a 25° C com fotoperíodo de 12 horas, foram realizados em balões de vidro com 5L de meio de cultura acrescidos de um volume inicial de  $5 \times 10^3 \text{ céL.mL}^{-1}$  sob aeração, com injeção contínua de ar ( $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ) à pressão ambiente. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por contagem celular em câmara Fuchs-Rozenthal, por fluorescência *in vivo* ou por densidade óptica. A velocidade de crescimento ( $\mu$ ) foi determinada na fase exponencial para cada cepa testada. Os ensaios foram interrompidos no início da fase estacionária para obtenção da biomassa seca e posteriores análises dos teores de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) por cromatografia gasosa. Um total de 8 cepas de diatomáceas foram estudadas, pertencentes a 5 gêneros (*Amphora*, *Entomoneis*, *Navicula*, *Odontella* e *Thalassiosira*) com duas espécies identificadas: *Entomoneis alata* e *Thalassiosira minima*. A maior velocidade de crescimento foi apresentada pela cepa M7C (*Navicula* sp 1.) com uma média de 1,79 divisões por dia. Os maiores rendimentos em biomassa seca foram obtidos pelas cepas M56C (*Biddulphia* sp.), M10C (*Thalassiosira minima*) e M17C (*Thalassiosira* sp.) totalizando 2070, 1732 e 1714  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. A quantidade de FAMEs por grama de biomassa foi maior nas cepas M19C (134  $\text{mg.g}^{-1}$ ) e M7C (120,6  $\text{mg.g}^{-1}$ ). A produtividade estimada de FAMEs por litro de cultivo foi maior na M56C, M17C e M10C apresentando, respectivamente, 183, 166,6 e 123  $\text{mg.L}^{-1}$ . A cepa M7C apresentou a maior variação de ácidos graxos, sendo 26 do total de 39 diferentes tipos encontrados. A cepa M10C (*Thalassiosira minima*) mostrou-se promissora para produção de biodiesel por apresentar uma média de velocidade de crescimento de 1,43 divisões por dia, o segundo maior rendimento em biomassa (1732  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e elevada produtividade de ácidos graxos por litro de cultivo (123  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

**Palavras chaves:** Microalgas. Bacillariophyceae. Biomassa. Meio Conway. FAME.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1– Fotografias em microscópio óptico da cepa M19C (*Amphora* sp.) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea ..... 27
- Figura 2 – A-C Fotografias em microscópio óptico da cepa M1C (*Entomoneis alata*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. .... 28
- Figura 3 – Fotografias em microscópio eletrônico de varredura da cepa M1C (*Entomoneis alata*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. 28
- Figura 4– Fotografias em microscópio óptico da cepa M7C (*Navicula* sp 1. cf. *N. perminuta*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea. .... 30
- Figura 5–Fotografias em microscópio eletrônico de varredura da cepa M7C (*Navicula* sp 1. cf. *N. perminuta*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. .... 30
- Figura 7 – Fotografias em microscópio óptico da cepa M27C (*Navicula* sp 3) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea ..... 31
- Figura 8: Fotografias em microscópio óptico da cepa M56C (*Odontella* sp. cf. *O. longicruris*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea ..... 32
- Figura 9 – Fotografias em microscópio óptico da cepa M10C (*Thalassiosira minima*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea ..... 34
- Figura 10– Fotografias em microscópio eletrônico de varredura da cepa M10C (*Thalassiosira minima*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. .... 34
- Figura 11– Fotografias em microscópio óptico da cepa M17C (*Thalassiosira* sp.) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea ..... 35
- Figura 12– Gráfico apresentando 4 tipos principais de ácidos graxos obtidos pelas diatomáceas . Percentuais de ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0),

palmitoléico (C16:1) e eicosapentaénico-EPA (C20:5) de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba..... 39

Figura 13 – Gráfico mostrando as quantidades (%) de FAMES classificados quanto a saturação nas 8 cepas de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba. .... 41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Composição do meio Conway (WALNE, 1966) preparado com água do mar filtrada e esterilizada ..... 21
- Tabela 2 Componentes que integram a formulação do meio Conway (WALNE, 1966) preparado com água do mar filtrada e esterilizada..... 22
- Tabela 3 Cepas diatomáceas marinhas do estado da Paraíba mantidas em cultivo monoespecífico em meio Conway no banco de culturas de microalgas do LARBIM/UFPB com seus respectivos táxons, procedência, códigos de armazenamento e data de isolamento. .... 25
- Tabela 4 Dados de cultivo em laboratório das 8 cepas de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba, apresentando: velocidade de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial de crescimento em dias (fase Log), total de biomassa seca produzida ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), total de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) ( $\text{mg.g}^{-1}$ ), estimativa de FAMES por litro de cultivo ( $\text{mg.L}^{-1}$ )..... 36
- Tabela 5 Diversidade e quantidade (%) de ésteres metílicos dos ácidos graxos das 8 cepas de diatomáceas do estado da Paraíba. Saturação dos ácidos graxos: SFA – saturados, MUFA – monosaturados, DUFA – diinsaturados, TUFA – triinsaturados e PUFA – poliinsaturados. .... 38

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
3.1 Cultivo de microalgas .....	16
3.2 Cultivo e potencial biotecnológico de diatomáceas.....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	20
4.1 Coleta de microalgas.....	20
4.2 Preparação do meio de cultura.....	20
4.3 Isolamento das diatomáceas a partir das amostras coletadas e desenvolvimento dos cultivos .....	22
4.3.1 <i>Ensaio laboratoriais de produção de biomassa para análises de ácidos graxos.</i> .....	23
4.4 Taxonomia .....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1 Espécies em cultivo monoespecífico .....	25
5.2 Taxonomia das espécies em cultivo monoespecífico .....	26
5.2.1 <i>Gênero Amphora Ehrenberg</i> .....	26
5.2.2 <i>Gênero Entomoneis Ehrenberg</i> .....	27
5.2.3 <i>Gênero Navicula Bory</i> .....	29
5.2.4 <i>Gênero Odontella C. Agardh</i> .....	32
5.2.5 <i>Gênero Thalassiosira Cleve</i> .....	33
5.3 Dados dos cultivos .....	35
5.3.1 <i>Análise Cromatográfica Do Perfil De Ácidos Graxos</i> .....	36
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

Diatomáceas são organismos eucarióticos microalgais unicelulares que podem existir sob formas coloniais (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990), geralmente alcançando tamanhos entre 2 a 200µm (HASLE; SYVERTSEN, 1996; KOOISTRA et al., 2007). São seres majoritariamente autótrofos (REVIERS, 2006), mas algumas espécies podem tornar-se heterótrofas, através da absorção de carbono inorgânico, e poucas são heterotróficas obrigatórias não possuindo clorofila, sendo incapazes de sintetizar substância de reserva através da fotossíntese (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990).

As diatomáceas estão incluídas na classe Bacillariophyceae da divisão Ochrophyta do grupo Stramenopiles, apresentando em torno de 285 gêneros englobando 10.000 a 12.000 espécies conhecidas (REVIERS, 2006), mas estima-se que existam cerca de 200.000 espécies (ARMBRUST, 2009).

Constituem um dos tipos mais comuns do fitoplâncton, encontrando-se em maior ou menor número nos biótopos marinho, dulcícola e de águas salobras, onde vivem como organismos planctônicos ou bentônicos. Também ocorrem em ambientes com temperatura altas e baixas, diferentes pH, e até mesmo em habitats hipersalinos. Podem ser epifíticas, epizóicas, endozóicas, endofíticas, cavernícolas, viver sobre detritos flutuantes, nos sedimentos, na neve, em ambientes terrestres úmidos e podem ser encontradas em simbiose com foraminíferos e esponjas (HASLE; SYVERTSEN, 1996; LOURENÇO, 2006; REVIERS, 2006).

A principal característica desse grupo é a utilização de sílica ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) como material estrutural para composição de uma parede celular dividida em duas metades geometricamente ornamentadas, a frústula, que possui grande valor taxonômico (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990). Baseado na simetria dessas frústulas, as diatomáceas são agrupadas em duas ordens: Penales, que possuem simetria bilateral, e as Centrales, que possuem simetria radial.

O principal carboidrato de reserva das diatomáceas é a crisolaminarina (BEATTIE; HIRST; PERCIVAL, 1961) e estas apresentam como pigmentos a clorofila *a*, *c*<sub>1</sub> e *c*<sub>2</sub> e uma grande quantidade de fucoxantina e outras xantofilas como a diadinoxantina e diatoxantina como pigmentos acessórios, que dão a coloração característica marrom dourada às células (LEE, 2008; REVIERS, 2006).

Este grupo desempenha um papel fundamental nos oceanos através da fixação de grande quantidade de dióxido de carbono e da síntese de carboidratos. Estima-se que as diatomáceas contribuam com cerca de 20 a 25% da produção primária líquida do planeta (WERNER, 1977), sendo responsáveis por cerca de 40% da produção primária líquida marinha (FALKOWSKI; BARBER; SMETACEK, 1998), representando os membros mais importantes do fitoplâncton que subsidiam a vida animal nos oceanos, fornecendo carboidratos essenciais, ácidos graxos, esteróis e vitaminas. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013).

No ambiente marinho a riqueza e abundância das diatomáceas varia em função da característica oligotrófica ou eutrófica da água. Em mar aberto, onde a água é tipicamente oligotrófica, a população de diatomáceas possui um grande número de espécies cada qual com baixo número de organismos. Em contraste, próximo à costa as diatomáceas estão em maior número, porém a quantidade de espécies na população é baixa (LEE, 2008).

A principal forma de reprodução das diatomáceas ocorre por propagação vegetativa através de sucessivas mitoses (a reprodução sexual ocorre em ocasiões mais raras). Desta forma as diatomáceas florescem rapidamente aumentando o número de células por várias ordens de magnitude em poucos dias (ARMBRUST, 2009). Apesar da abundância e diversidade encontrada nos ambientes naturais algumas espécies são cultivadas para fins como aquicultura e extração de produtos biotecnologicamente relevantes (LEBEAU; ROBERT, 2002).

As diatomáceas têm recebido mais atenção recentemente, devido ao seu enorme potencial econômico. Nas últimas décadas a pesquisa mundial acerca das diatomáceas tem crescido além da perspectiva ecológica e taxonômica, somando-se a estas a busca sobre os usos práticos em aplicações comerciais e industriais (BOZARTH; MAIER; ZAUNER, 2009).

Diversas áreas de aplicações têm se desenvolvido como a produção de silício provindo das frústulas para aplicações tecnológicas em nanotecnologia, na remediação de poluentes, para aplicações farmacêuticas, cosméticas e químicas, através de seus metabólitos intracelulares acumulados nas células como os ácidos graxos para produção de biocombustíveis, além de metabólitos extracelulares liberados no meio como, por exemplo, vários pigmentos e antibióticos (LEBEAU; ROBERT, 2002).

Com o avanço das tecnologias, da biologia molecular, da caracterização genômica de espécies modelo de diatomáceas, da melhoria dos meios de cultura, bem

como da melhoria nas condições hidráulicas e de engenharia dos sistemas de cultivos abertos (lagoas, canais profundos, unidades com circulação, etc.) e fechados (fotobiorreatores) a produção de diatomáceas vem se tornando uma fonte promissora de novas substâncias com relevância generalizada (BOZARTH; MAIER; ZAUNER, 2009; CORTÉS, 2009; KROTH, 2007).

As perspectivas sobre o potencial do cultivo, que trazem benefícios tanto econômicos quanto ambientais, sugerem uma importância em explorar áreas de pesquisas tanto acerca da diversidade das diatomáceas da Paraíba como através da caracterização dos cultivos laboratoriais e/ou em médias e largas escalas visando o conhecimento sobre taxonomia, crescimento celular e metabólitos produzidos pelas espécies de diatomáceas locais.

Os vários fatores como a diversidade de espécies conhecidas e estimadas de diatomáceas, a variedade de respostas que podem ser obtidas através de diferentes condições de cultivos, além da localização intertropical da Paraíba que provê condições de clima, como temperatura e incidência solar, favoráveis ao cultivo microalgal tornam promissores os estudos sobre a bioprospecção deste grupo.

Desta forma, este trabalho busca isolar cepas de diatomáceas do ambiente marinho paraibano visando à caracterização das mesmas através de cultivo laboratorial com o intuito de conhecer o desempenho da cultura e os ácidos graxos produzidos pelas espécies locais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Obter cultivos monoespecíficos de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba, isoladas de diferentes tipos de habitats, visando a sua caracterização taxonômica e capacidade de produção de ésteres metílicos de ácidos graxos importantes para a produção de biodiesel ou outros usos biotecnológicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Coletar amostras de água e de sedimento de ambientes marinhos costeiros e estuarinos do estado da Paraíba e fragmentos de diversas espécies de invertebrados bênticos dos recifes costeiros do Cabo Branco com o propósito de isolar diatomáceas que vivem nesses diferentes tipos de habitats;
- b) Obter cultivos monoespecíficos de diatomáceas isoladas dos materiais coletados que apresentam crescimento em meio de cultura sintético;
- c) Identificar taxonomicamente ao menor nível possível as cepas isoladas;
- d) Caracterizar a velocidade de crescimento e o rendimento máximo em biomassa das espécies de diatomáceas isoladas, em condições experimentais de cultivo;
- e) Determinar os teores e a diversidade dos ésteres metílicos de ácidos graxos nas cepas cultivadas, avaliando seus potenciais usos em aplicações biotecnológicas.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Cultivo de microalgas

O cultivo microalgal corresponde a experimentos com populações de microalgas que podem ser preservadas vivas em condições artificiais e controladas de desenvolvimento para diversos fins, podendo prover informações úteis para a agregação de conhecimento sobre as espécies. As condições controladas são geralmente bastante promissoras para o desenvolvimento das espécies, fazendo do cultivo uma ferramenta essencial para a produção de biomassa (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004).

Historicamente o primeiro registro que é considerado como cultivo de microalga foi realizado pelo alemão Ferdinand Cohn em 1850 que manteve viva em seu laboratório a *Haematococcus*, espécie de alga verde flagelada de água doce. Porém, o desenvolvimento dos primeiros estudos experimentais sobre o cultivo de microalgas é atribuído a Famintzin em 1871 (ANDERSEN; PREISIG, 2005).

As pesquisas iniciais sobre o cultivo microalgal foram importantes na descoberta das relações das microalgas com o meio físico e químico. A partir de então os cultivos foram sendo cada vez mais elaborados, e, aliados às pesquisas científicas paralelas realizadas em diversas áreas, os experimentos de cultivos foram se tornando mais promissores. Durante o final do século XIX Miquel elaborou estudos fundamentais sobre o isolamento e cultivo de diatomáceas marinhas e de água doce, introduzindo técnicas como o uso de micropipetas e diluição sequencial para o isolamento de diatomáceas (ANDERSEN; PREISIG, 2005; LOURENÇO, 2006).

Em meados do século XX muito conhecimento havia sido gerado pelas pesquisas e as diversificações intensificaram-se surgindo mais estudos – sobre a bioquímica, fisiologia, ontogenia, ecologia e genética – acerca da biologia das microalgas. A partir deste período novas pesquisas começaram a surgir rumando para a produção de biomassa algácea com o objetivo de aplicação comercial, onde, a priori, foi estabelecido o interesse em produzir alimento para animais e humanos. A produção em grande escala de microalgas obteve resultados promissores alavancando alguns estudos sobre o cultivo intensivo de microalgas em vários países. Foram desenvolvidos modelos de cultivos em massa e a produção de biomassa em maior quantidade era útil para análises químicas das espécies. A produção literária acerca do cultivo de microalgas

creceu conjuntamente às pesquisas estimulando o interesse de outros pesquisadores (ANDERSEN; PREISIG, 2005; LOURENÇO, 2006).

A realização de experimentos, durante os anos de 1960 e 1970, sobre o crescimento microalgal em condições variadas de fatores abióticos evidenciou a plasticidade de respostas de diversas espécies às variáveis testadas levando ao conhecimento que populações de uma mesma espécie, proveniente de localidades diferentes, poderiam apresentar respostas muito diferentes em experimentos virtualmente iguais. Tais resultados mostraram que as microalgas possuíam variedades genéticas entre as várias linhagens de uma mesma espécie, fato que evidenciava um potencial quase infinito de possibilidades de respostas aos experimentos de acordo com as cepas utilizadas e condições empregadas (LOURENÇO, 2006).

Após 1970, impulsionada pela crise energética internacional, estudos sobre aplicações biotecnológicas de microalgas, além da produção alimentícia, foram estimulados passando as microalgas a serem consideradas como conversores eficientes de energia. Análises sobre a composição centesimal das microalgas foram sendo incorporadas às pesquisas. E como influência dos estudos em ciência e tecnologia de alimentos, análises do perfil de ácidos graxos de microalgas utilizadas na aquicultura foram cada vez mais valorizados. Em um contexto geral o final do século XX e início do XXI foram marcados pelo aumento das pesquisas biotecnológicas acerca das microalgas para estudos abrangendo diversos enfoques como na produção alimentícia, energética, farmacêutica, bioquímica, nanotecnológica e no tratamento de resíduos e efluentes. (ANDERSEN; PREISIG, 2005; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; LOURENÇO, 2006).

Em ambientes naturais são escassos os eventos em que a quantidade de biomassa microalgal disponível é suficiente para a extração e utilização comercial e industrial, logo, os cultivos mostram-se como ferramentas essenciais que viabilizam o aproveitamento das microalgas para uma vasta diversidade de aplicações. Em condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas tendem a crescer vorazmente. O método de cultivo mais utilizado baseia-se na composição de condições eutróficas que possibilita o rápido crescimento populacional. Através desse método um meio de cultivo, composto com elementos necessários ao crescimento microalgal, é inoculado com uma porção de microalgas da espécie-alvo promovendo um ambiente propício para o crescimento populacional em um curto espaço de tempo (LOURENÇO, 2006).

O emprego de novas tecnologias no cultivo em grande escala somado à variabilidade de compostos bioquímicos sintetizados pelas microalgas permitem que determinadas espécies sejam utilizadas para elaboração de alimentos e para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (BIANCHINI et al., 2006). Várias das substâncias produzidas pelas microalgas também se encontram nas plantas, mas o cultivo de microalgas se destaca por algumas vantagens como: velocidade de crescimento — maior que a das plantas terrestres para muitas espécies de microalgas, possibilitando maiores rendimentos anuais em biomassa; diferente das plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas como o fruto, as microalgas, por serem unicelulares, produzem uma biomassa com a mesma composição bioquímica; os cultivos podem desenvolver-se com água marinha, estuarina, água proveniente de diversos processos de produção (agropecuária, indústrias, desejos domésticos, etc); além da possibilidade da manipulação das condições de cultivo que podem induzir a síntese de compostos de interesse (BIANCHINI et al., 2006; RICHMOND, 2004).

Os tipos de sistemas e técnicas de cultivo variam de acordo com a necessidade de produção e irão abordar uma gama de variáveis que influenciarão o desenvolvimento da cultura (LEBEAU; ROBERT, 2002). Fatores como a biologia da microalga, a energia necessária, nutrientes, clima e o tipo do produto final devem ser considerados antes que um sistema de cultivo seja escolhido. O principal problema enfrentado para a comercialização de microalgas e seus produtos são os custos de manutenção dos sistemas de cultivo que necessitam de clima artificial e dos reagentes químicos usados para elaboração do meio de cultura, o que torna a produção expensiva (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; BOROWITZKA, 1999). Como solução a estes problemas sistemas de cultivos vêm sendo otimizados e meios de culturas alternativos, como esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores, lodo digerido, despejos industriais purificados, vinhaça, etc, estão sendo introduzidos para a minimização do custo de produção (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008). Em alguns casos os cultivos são realizados com algas heterotróficas, evitando os custos com iluminação, porém nem todas as algas e seus produtos podem se desenvolver nessas condições (BOROWITZKA, 1999).

À medida que o conhecimento sobre o cultivo de microalgas cresce, novas tecnologias vão somando para otimizar a produção. Cultivos têm sido desenvolvidos em fotobiorreatores apresentando vários formatos para melhoramento da produção,

construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato, onde é possível controlar as condições do cultivo aumentando a produtividade e conseqüentemente a viabilidade da produção de microalgas e seus produtos de interesse biotecnológico (BIANCHINI et al., 2006).

### **3.2 Cultivo e potencial biotecnológico de diatomáceas**

Os cultivos com diatomáceas de interesse biotecnológico têm se desenvolvido durante os últimos anos, com exceção do cultivo comercial voltado para a aquicultura (BOZARTH; MAIER; ZAUNER, 2009; LEBEAU; ROBERT, 2002). E, apesar do sucesso adaptativo das diatomáceas em diversas partes do planeta, conferindo-lhes enorme diversidade e abundância, apenas poucas espécies são cultivadas e usadas biotecnologicamente (LEBEAU; ROBERT, 2003).

Vários sistemas de cultivo são utilizados para o crescimento de diatomáceas e as vantagens e desvantagens estão ligadas diretamente ao tipo de cultivo, sendo então necessária a escolha que melhor represente o custo-benefício da produção e do produto de interesse final. Em todo caso, fatores básicos são a chave para o cultivo como a biologia da diatomácea, a iluminação, a temperatura, os nutrientes, o pH, entre outros; fatores que quando bem controlados proporcionam a otimização do cultivo (LEBEAU; ROBERT, 2002).

Diatomáceas produzem naturalmente diversas substâncias de interesse econômico, tornando-as um recurso valioso para a aquisição de suplementos alimentares e substitutos para substâncias sintéticas que vão desde produtos químicos e cosméticos até combustíveis para aviação (BOZARTH; MAIER; ZAUNER, 2009). Aplicações comerciais e industriais incluem biofertilizantes, energia renovável (através da produção de biocombustíveis), produtos farmacêuticos, biomoléculas, materiais relevantes para aplicações em nanotecnologias ou chips de computador, uso de diatomitos (para filtros, isolamento, absorção, materiais de construção, cargas minerais e como abrasivo fino, e em diversos tipos de indústrias como de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, químicos e agrícolas, entre outros), além de agregados econômicos e ecológicos como bioremediadores de água contaminada, síntese de carbono e desintoxicação de resíduos industriais que são utilizados como substrato (BOZARTH; MAIER; ZAUNER, 2009; LEBEAU; ROBERT, 2002, 2003; LOPEZ et al., 2005).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta de microalgas

Foram realizadas coletas de água visando à obtenção de culturas de microalgas em períodos aleatórios ao longo de 2009 e 2012 nas praias do Seixas, Intermares e Cabo Branco, obtendo-se nesta última localidade amostras da água do mar, da areia da praia e de invertebrados bênticos recifais (*Cinachyrella* sp. e *Siderastrea* spp.). A coleta foi feita manualmente usando garrafas pet para amostras de água e sacos de plástico reforçado para amostras de areia e de exemplares dos invertebrados.

As amostras foram mantidas em um recipiente fechado para o transporte e subseqüente armazenamento para cultivo no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/DSE/UFPB). O material coletado foi inoculado em balões ou erlenmeyer de vidro de 250 ml contendo o meio de cultura, Conway preparado com água do mar, específico para crescimento das diatomáceas. Os exemplares de *Cinachyrella* sp foram macerados em placas de Petri com água do mar filtrada e os fragmentos de *Siderastrea* sp. tiveram seus tecidos removidos por jatos de compressão a ar usando um waterpick®. O material obtido por esses procedimentos foi inoculado em balões ou erlenmeyers de 250ml contendo meio de cultura para diatomáceas.

Todos os inóculos foram mantidos em uma câmara de cultura para aclimação e crescimento, a  $25 \pm 1$  °C com sistema de iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia de 40W com fotoperíodo de 12 horas montadas em prateleiras abertas com iluminação acima dos frascos de cultivo, sendo o sistema controlado por uma fotocélula externa. As prateleiras são revestidas de material branco assim como as paredes da câmara com o propósito de maximizar o aproveitamento da luz.

### 4.2 Preparação do meio de cultura

Para o isolamento e posterior cultivo das diatomáceas foi utilizado o meio de cultura Conway (WALNE, 1966), elaborado com água do mar filtrada em filtro de fibra

de vidro Whatman GF/C de 47mm de diâmetro, sendo em seguida autoclavada e deixado em repouso durante 24h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o meio é constituído adicionando-se nutrientes em concentrações pré-estabelecidas, necessárias para o crescimento de algas. As formulações desse meio são apresentadas nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1— Composição do meio Conway (WALNE, 1966) preparado com água do mar filtrada e esterilizada**

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>
I. Água do mar	1.000 ml
II. Solução principal (estoque)	1,0 ml
III. Solução de vitaminas (estoque)	1,0 ml
IV. Solução de silicato (estoque)	2,0 ml

**Fonte: WALNE (1966)**

A composição da solução principal foi feita através da dissolução dos componentes da mesma em 900 ml de água destilada complementando o volume até 1000 ml. Para a composição da solução de metais, usada como componente da solução principal dissolveu-se os componentes da mesma em 90 ml de água destilada (acrescentando cada sal após a dissolução completa do sal anterior) completando o volume até 100 ml. Na solução de vitaminas dissolveram-se os componentes da mesma em 90 ml de água destilada completando o volume até 100 ml. Para a solução de silicato dissolveu-se os 4,0 g de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 100 ml de água destilada (esta solução é adicionada na composição do meio quando este é utilizado para o cultivo de diatomáceas e silicoflagelados). Na composição no meio Conway primeiro adiciona-se 1,0 ml da solução de metais na solução principal. Para cada litro de água do mar foram adicionados 1,0 ml da solução principal, 2,0 ml da solução de silicato e 0,1 ml da solução de vitaminas.

**Tabela 2: Componentes que integram a formulação do meio Conway (WALNE, 1966) preparado com água do mar filtrada e esterilizada.**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Solução principal</b>	
EDTA	45,0 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,30 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,36 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	20,0 g
NaNO <sub>3</sub>	100 g
Solução de metais*	1,0 ml
Água destilada	1000 ml
<b>* Solução de metais</b>	
ZnCl <sub>2</sub>	2,1 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,90 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,0 g
Água destilada	100 ml
<b>Solução de vitaminas</b>	
Tiamina (B1)	100mg
Cianocobalamina (B12)	5mg
Biotina (H)	0,5
Água destilada	100ml
<b>Solução de silicato</b>	
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	4,0 g
Água destilada	100 ml

Fonte: WALNE (1966)

### **4.3 Isolamento das diatomáceas a partir das amostras coletadas e desenvolvimento dos cultivos**

O processo de isolamento de cepas contidas nas amostras inoculadas visou a obtenção de cultivos monoespecíficos de diatomáceas. Este procedimento foi realizado por meio de micropipetagem e diluições sucessivas. Uma gota da amostra coletada era colocada em uma lâmina para observação no microscópio óptico comum (aumento 10x). Com ajuda de uma micropipeta capilar<sup>1</sup> acoplada a uma mangueira de látex as amostras eram pipetadas e separadas sendo geradas porções cada vez menores de forma

<sup>1</sup>Micropipeta capilar produzida em laboratório com um tubo de vidro de pequeno calibre auxiliado pelo bico de Bunsen.

que nessas diluições uma só célula de diatomácea fosse capturada e reinoculada em um tubo de ensaio contendo o meio Conway. O tubo de ensaio era levado para a câmara de cultura e armazenado para crescimento e posterior análise em microscópio. Caso não fosse verificado o crescimento unialgal o processo de micropipetagem era repetido tantas vezes quanto necessário fosse, até que culturas monoespecíficas fossem obtidas.

As culturas unialgais obtidas a partir das amostras coletadas foram codificadas e incluídas na Coleção de Microalgas do LARBIM/UFPB. Repicagens mensais das cepas mantidas em cultivo são efetuadas com o propósito de manter as espécies isoladas sempre em condições ótimas de crescimento.

#### 4.3.1 *Ensaios laboratoriais de produção de biomassa para análises de ácidos graxos.*

Os ensaios laboratoriais de produção de biomassa foram desenvolvidos na câmara de cultura climatizada do LARBIM (temperatura  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ) em balões de vidro com capacidade de 6L contendo 5L de meio de cultura no qual foram adicionados B um volume inicial de células de cada espécie que estavam sendo otimizadas em balões de 250 ml. A densidade celular inicial dos cultivos foi em torno de  $5 \times 10^3 \text{cél.mL}^{-1}$  de diatomáceas. Os cultivos foram desenvolvidos sob aeração, com injeção contínua de ar ( $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ) a pressão ambiente, usando um minicompressor de membrana Resun AOC2.

O acompanhamento do crescimento de cada espécie de diatomáceas nos cultivos foi realizado através de contagens celulares em câmaras de Fuchs-Rozenthal em microscópio óptico binocular Leica DM2500, ou por medidas da fluorescência *in vivo* usando o fluorômetro Turner Design 10005R e/ou ainda através de medidas da densidade óptica em um espectrofotômetro Evolution 60.

Os dados dos cultivos foram organizados em planilha Excel e as curvas de crescimento de cada espécie foram obtidas. Os cultivos foram interrompidos no início da fase estacionária e a biomassa produzida foi centrifugada em centrífuga refrigerada a  $18^\circ\text{C}$  e em seguida congelada a  $-40^\circ\text{C}$  e posteriormente liofilizados em liofilizador Terroni resultando na biomassa seca que foi pesada e armazenada em recipiente hermético para análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

A velocidade de crescimento ( $\mu$ ), que exprime o número de divisões celulares por unidade de tempo, usando a equação proposta por Stein (1973)(1).

$$k = (3,322/(T_2 - T_1)) \cdot (\text{Log } N_2/N_1)(1)$$

onde:  $k$  é a velocidade de crescimento, 3,322 é o fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10,  $T_2 - T_1$  é o intervalo de tempo em dias,  $N_1$  é a densidade celular inicial,  $N_2$  é a densidade celular final, e  $Log$  é o logaritmo na base de 10.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos, também chamados de FAMES (Fatty Acids Methyl Ester) foram analisados quanto ao seu teor e composição no Laboratório de Métodos de Extração e Separação da Universidade Federal de Goiás (LAMES/UFG) através de cromatografia gasosa com Cromatógrafo a gás Agilent 7890 equipado com detector FID e injetor split/splitless conforme proposto por (MENEZES et al., 2013).

#### 4.4 Taxonomia

Todas as cepas de diatomáceas cultivadas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico Leica DM2500 com câmera digital acoplada DFC 295 e sistema de captura de imagens em computador. Alíquotas da biomassa de cada espécie foram submetidas ao processo de oxidação através do método de MÜLLER-MELCHERS e FERRANDO (1956), visando com isso efetuar a limpeza das frústulas para melhor visualização dos caracteres taxonômicos utilizados para a identificação das espécies.

A técnica de oxidação consiste em manter a biomassa de diatomáceas em permanganato de potássio por 24h, e quando passado esse tempo uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio é colocado seguido de gotas de ácido sulfúrico até que a solução contendo a suspensão de células fique incolor, indicando, neste ponto, que toda matéria orgânica foi oxidada. Lavagens sucessivas com água destilada em centrífuga são efetuadas a fim de remover a acidez da amostra. O material assim preparado é mantido em frascos de vidro com formol a 4%, devidamente etiquetados, para análises em microscopia óptica, e em álcool isopropílico para análises em microscopia eletrônica de varredura.

Lâminas permanentes foram preparadas com o material oxidado usando a resina Cumar R-9 (Cumarone, índice de refração 1,6). As lâminas foram observadas em diversos aumentos em microscópio óptico Leica e cada espécie foi fotografada em vários aumentos. Fotografias em aumentos de até 40000x também foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura de marca FEI Quanta 450, pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais da UFPB, sendo as frústulas colocadas em stubs metálicos sem recobrimento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Espécies em cultivo monoespecífico

Foram isoladas e mantidas em cultivos monoespecíficos 8 cepas de microalgas pertencentes a 5 gêneros (*Amphora*, *Entomoneis*, *Navicula*, *Odontella*, *Thalassiosira*) provenientes da praia do Cabo Branco, Intermares e Seixas, estas foram codificadas e preservadas no banco de cultura de Microalgas da UFPB localizada no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB). Os táxons, bem como a procedência, a data de isolamento e o código na qual estas se encontram no banco de cultura de microalgas estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3 —Cepas diatomáceas marinhas do estado da Paraíba mantidas em cultivo monoespecífico em meio Conway no banco de culturas de microalgas do LARBIM/UFPB com seus respectivos táxons, procedência, códigos de armazenamento e data de isolamento.**

<b>Espécie</b>	<b>Procedência</b>	<b>Código</b>	<b>Data de isolamento</b>
<i>Amphora</i> sp.	Cabo Branco (extraído da esponja <i>Cynachrella</i> sp.)	M19C	10/3/2012
<i>Entomoneis alata</i>	Cabo Branco (água do mar)	M1C	21/08/2009
<i>Navicula</i> sp1.cf. <i>N. perminuta</i>	Cabo Branco (extraída do coral <i>Siderastrea</i> spp.)	M7C	14/03/2010
<i>Navicula</i> sp2. cf. <i>N.reinhardtii</i>	Cabo Branco (água do mar)	M27C	28/06/2011
<i>Navicula</i> sp3.	Praia do Seixas (água do mar)	M16C	01/10/2010
<i>Odontella</i> sp. cf. <i>O. longicruris</i>	Cabo Branco (areia da praia)	M56C	03/06/2011
<i>Thalassiosira minima</i>	Cabo Branco (água do mar)	M10C	22/05/2010
<i>Thalassiosira</i> sp.	Intermares (água do mar)	M17C	21/08/2009

## 5.2 Taxonomia das espécies em cultivo monoespecífico

### 5.2.1 Gênero *Amphora* Ehrenberg

Filo Ochrophyta Cavalier-Smith & E.E.Chao, 1996.

Classe Bacillariophyceae Haeckel, 1878.

Ordem Thalassiophysales D. G. Mann, 1990.

Família Catenulaceae Mereschkowsky, 1902.

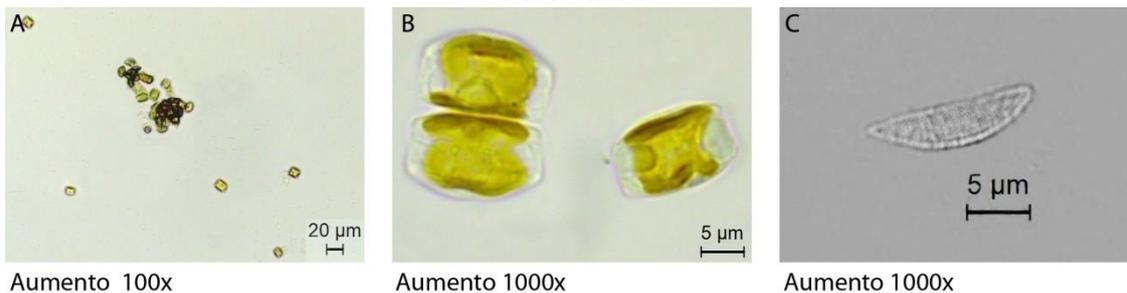
*Amphora* Ehrenberg ex Kützing, 1844.

O gênero *Amphora* tem uma distribuição cosmopolita. Estão presentes principalmente em ambientes marinhos, com poucos membros continentais e alta diversidade em lagos salinos. Em sua maioria os representantes do gênero são epifíticos, epilíticos e perifíticos (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990; SALA; MAIDANA, 2003). As valvas são assimétricas em relação ao eixo apical e simétricas em relação ao eixo transapical. Na margem dorsal o manto é mais profundo ou superior do que na região da margem ventral. Como resultado as frústulas tem formato cuneiforme. Tal formato limita o foco total em um plano focal. A rafe pode ser reta, arqueada, ou ligeiramente sigmoide. Dependendo da posição da valva, as estrias na margem ventral podem ser difíceis de serem visualizadas (KOCIOLEK; SPAULDING, 2003).

#### A. *Amphora* sp. (M19C)

**Descrição:** Apresenta simetria bilateral com valvas isopolares e assimétricas em relação ao eixo apical e com extremidade cuneiforme. Rafes lineares estão presentes nas duas valvas. Estrias dificilmente visível em microscopia óptica. Células solitárias, mas comumente formando grumos em cultivos. Coloração marrom-dourada. Tamanho entre 8 a 15  $\mu\text{m}$  (Figura 1 A-C).

**Figura 1– Fotografias em microscópio óptico da cepa M19C (*Amphora* sp.) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea**



### 5.2.2 Gênero *Entomoneis* Ehrenberg

Filo Ochrophyta Cavalier-Smith & E.E.Chao, 1996.

Classe Bacillariophyceae Haeckel, 1878.

Ordem Surirellales D. G. Mann, 1990.

Família Entomoneidaceae Reimer, 1975.

*Entomoneis* Ehrenberg C. G, 1845

#### A. *Entomoneis alata* Ehrenberg, 1845. (M1C)

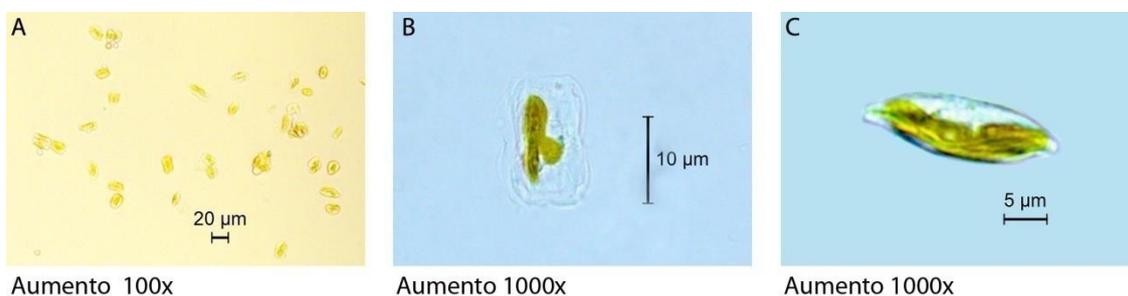
As células são solitárias, torcidas sobre o eixo apical quando em vista pleural. Geralmente aparecem bilobadas. A torção da célula significa que a frústula pode se apresentar em uma variedade de aspectos dependendo do plano focal que se observa.

*Entomoneis alata* se encontra em baías, plataformas continentais e zonas pelágicas (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990). Sua distribuição inclui a Europa: Mar Adriático, Mar Negro, Alemanha, Irlanda, Romênia, Espanha. Ilhas do Atlântico: Ilhas Canárias. América do Norte: Grandes Lagos, Estados Unidos da América. América do Sul: Brasil, Colômbia. Austrália e Nova Zelândia: Nova Zelândia (ALGAEBASE, 2014a)

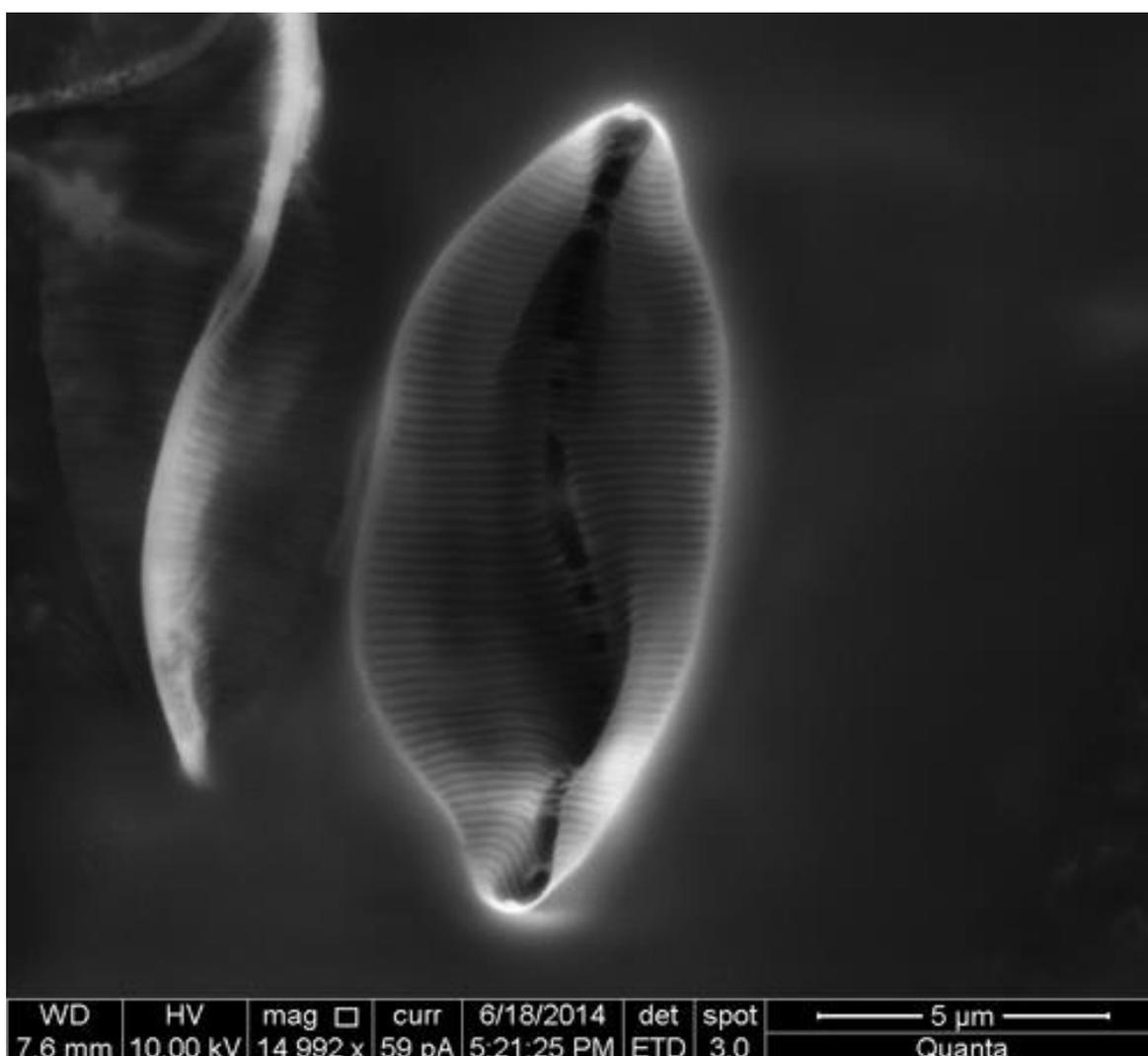
**Descrição:** Apresenta simetria bilateral com a frústula em formato elíptico com uma constrição transapical. Valvas elipsoidais em vista valvar, com lados côncavos e ápices

ligeiramente apiculados. Encontrada como células solitárias, diâmetro variando entre 12 a 17 $\mu\text{m}$ . Apresenta plastídios com coloração marrom-dourada (Figura 2 A-C e 3).

**Figura 2 – A-C Fotografias em microscópio óptico da cepa M1C (*Entomoneis alata*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB.**



**Figura 3 – Fotografias em microscópio eletrônico de varredura da cepa M1C (*Entomoneis alata*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB.**



### 5.2.3 Gênero *Navicula* Bory

Filo Ochrophyta Cavalier-Smith & E.E.Chao, 1996.

Classe Bacillariophyceae Haeckel, 1878.

Ordem Naviculales Bessey, 1907.

Família Naviculaceae Kützing, 1844.

*Navicula* Bory de Saint-Vicent, 1822.

O gênero *Navicula* pertence à família *Naviculaceae* Kützing, que é a maior família de diatomáceas dulcícolas apresentando também representantes em água salgada e salobra. Seus representantes são caracterizados principalmente porque vão desde células pequenas a grandes, de finas a grosseiramente estruturadas. Os três eixos: apical, transapical e perivalvar são geralmente isopolares e retos; os folhetos são lineares, lanceoladas ou elípticas e os ramos da rafe se localizam no centro e estão bem desenvolvidas em ambas as valvas (TOLEDO; COMAS, 2008). Três morfótipos deste gênero foram isoladas das amostras coletadas e se acham mantidas em cultivos unialgais no banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB.

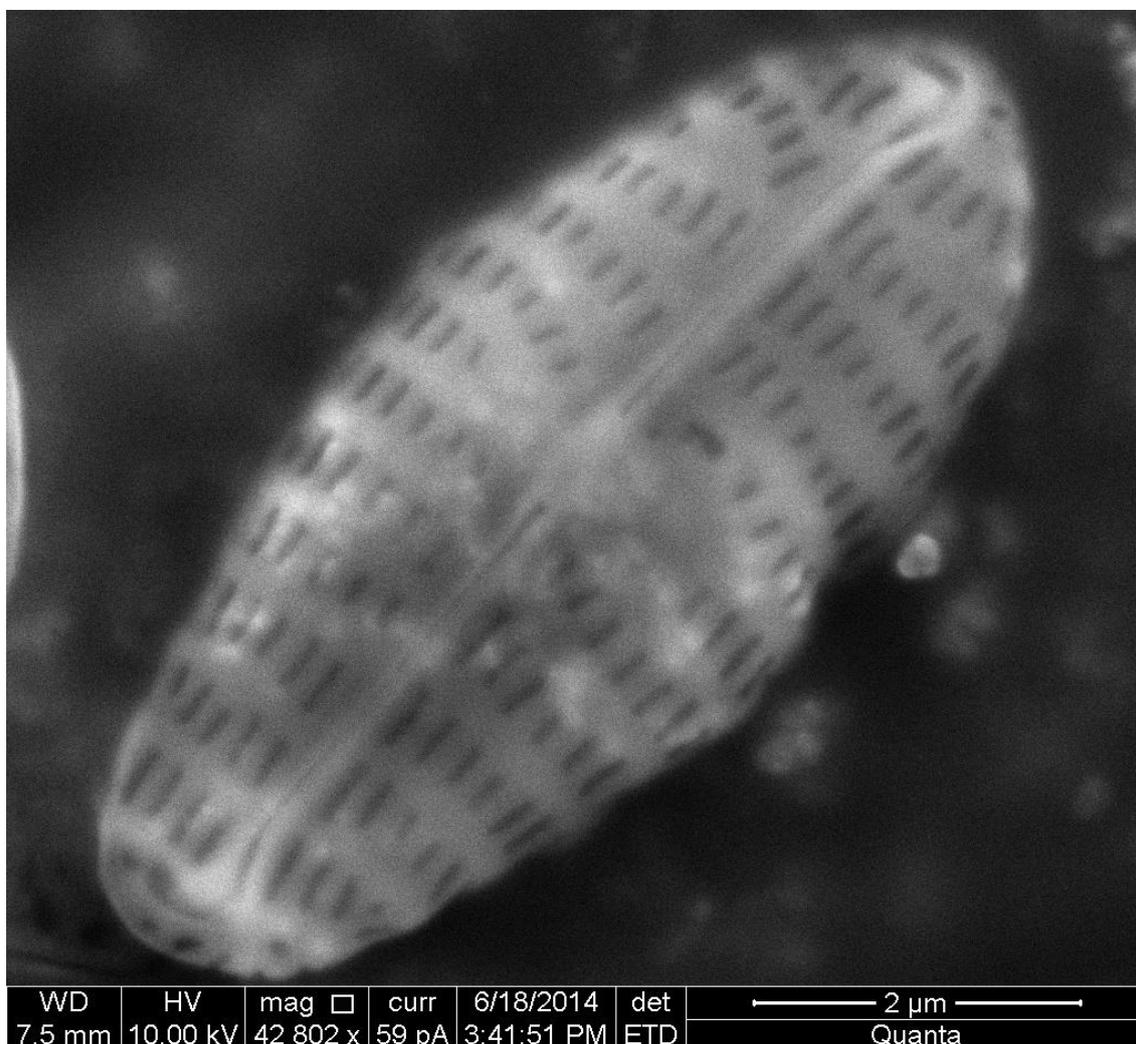
#### A. *Navicula* sp 1. cf. *N. perminuta* Grunow, 1880. (M7C)

**Descrição:** Apresenta simetria bilateral e frústula isovalvar com rafe central e estrias perpendiculares ao sentido desta. Encontrada em células solitárias. Coloração marrom-dourada. Tamanho entre 7 a 9  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Vistas em microscopia eletrônica de varredura as estrias apresentam-se como poros retangulares estreitos e longos e a rafe filiforme, reta, com fissuras terminais voltadas para a mesma direção (Figura 4e 5).

**Figura 4–** Fotografias em microscópio óptico da cepa M7C (*Navicula* sp 1. cf. *N. perminuta*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea.



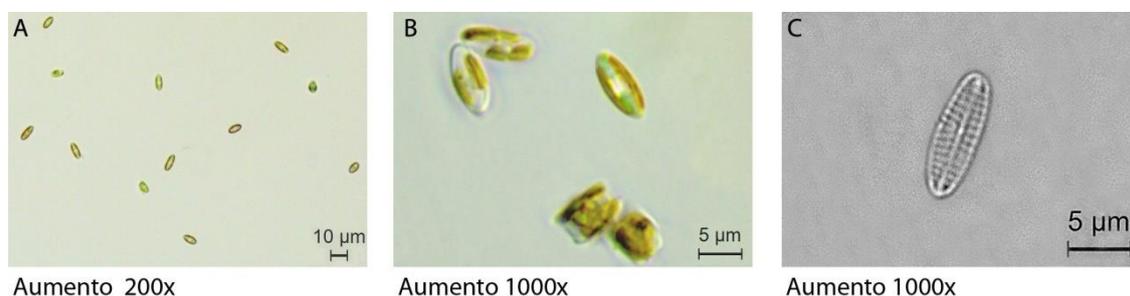
**Figura 5–**Fotografias em microscópio eletrônico de varredura da cepa M7C (*Navicula* sp 1. cf. *N. perminuta*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB.



**B. *Navicula* sp 2. cf. *N.reinhardtii* Grunow, 1880 (M16C)**

**Descrição:** Apresenta simetria bilateral frústula isovalvar com rafe central retilínea. Estrias perpendiculares ao sentido das rafes. Encontrada em células solitárias. Coloração marrom-dourada. Tamanho entre 6 a 9  $\mu\text{m}$ . Ao microscópio óptico pode-se observar a posição das estrias na frústula. Sendo possível visualizar também que na área central da frústula, próximo à rafe, o ângulo entre as estrias centrais diminui, característica semelhante à espécie *Navicula reinhardtii* Grunow 1880 (Figura 6)

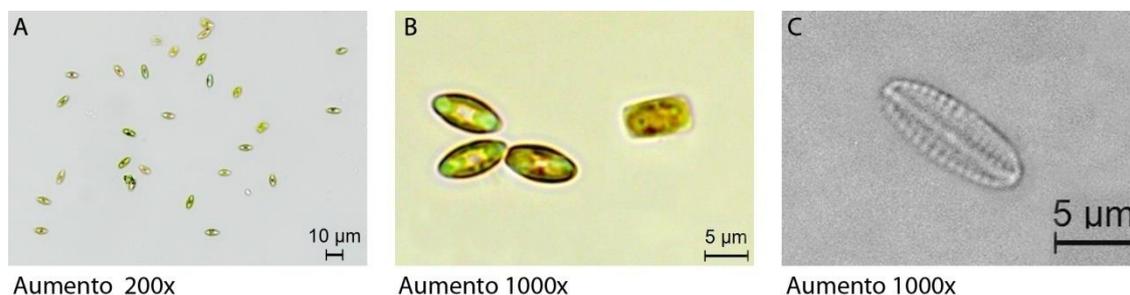
**Figura 6– Fotografias em microscópio óptico da cepa M16C (*Navicula* sp 2. cf. *N.reinhardtii*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea**



**C. *Navicula* sp 3.(M27C)**

**Descrição:** Apresenta simetria bilateral com a frústula no formato isovalvar com rafe central e filiforme, retilínea. Estrias perpendiculares ao sentido das rafes. Coloração marrom-dourada. Tamanho entre 7 a 8  $\mu\text{m}$  (Figura 7 A-C).

**Figura 6 – Fotografias em microscópio óptico da cepa M27C (*Navicula* sp 3) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea**



### 5.2.4 Gênero *Odontella* C. Agardh

Filo Ochrophyta Cavalier-Smith & E.E.Chao, 1996.

Classe Coscinodiscophyceae Round & R.M.Crawford, 1990.

Ordem Triceratiales, Round & R.M.Crawford, 1990

Família Triceratiaceae (Schütt) Lemmermann, 1899.

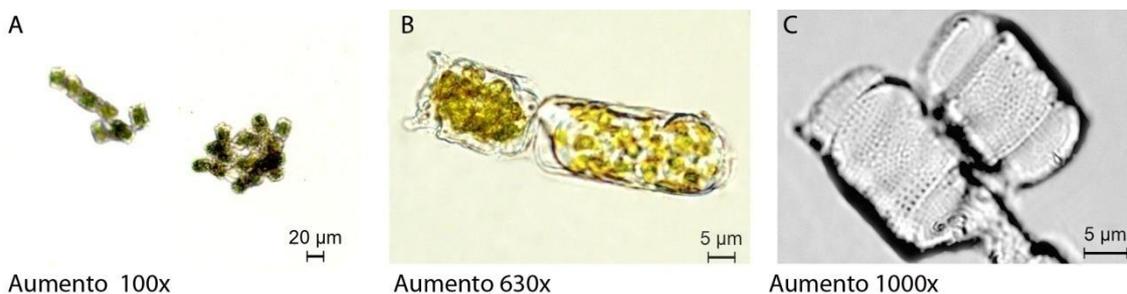
*Odontella* C. Agardh, 1832.

Os representantes do gênero *Odontella* podem ser marinhos, planctônicos e epifíticos. Apresentam células alongadas na visão da cintura, com espinhos longos e elevações apicais. Muitas vezes formando cadeias pelos processos, com os espinhos tubulares atravessando o outro. Numerosos plastídeos pequenos e discoides. Valvas elípticas ou lanceoladas, sem separação entre o rosto e o manto. Face valvar simples ou com grânulos finos, espículas, as vezes com duas cristas. Parede loculada com poros externos finos (ALGAEBASE, 2014b).

#### A. *Odontella* sp.cf. *O. longicuris* Hoban, 1983 (M56C)

**Descrição:** Célula robusta contendo vários plastídios. Frústula com valvas retangulares. Porção central que interliga as duas bandas mais elevada e com poros presentes. Superfície com protuberâncias espinhosas. Coloração marrom-dourada. Tamanho entre 10 a 25  $\mu\text{m}$ . Em cultivo os representantes desta espécie exibem elevado grau e polimorfismo, mas formas típicas bastante semelhantes à espécie *Odontella longicuris* Greville, 1859 podem ser observadas (Figura 8 A-C).

**Figura 7: Fotografias em microscópio óptico da cepa M56C (*Odontella* sp. cf. *O. longicuris*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea**



### 5.2.5 Gênero *Thalassiosira* Cleve

Filo Ochrophyta Cavalier-Smith & E.E.Chao, 1996.

Classe Coscinodiscophyceae Round & R.M.Crawford, 1990

Ordem Thalassiosirales Glezer & Makarova 1986

Família Thalassiosiraceae Hasle, 1973.

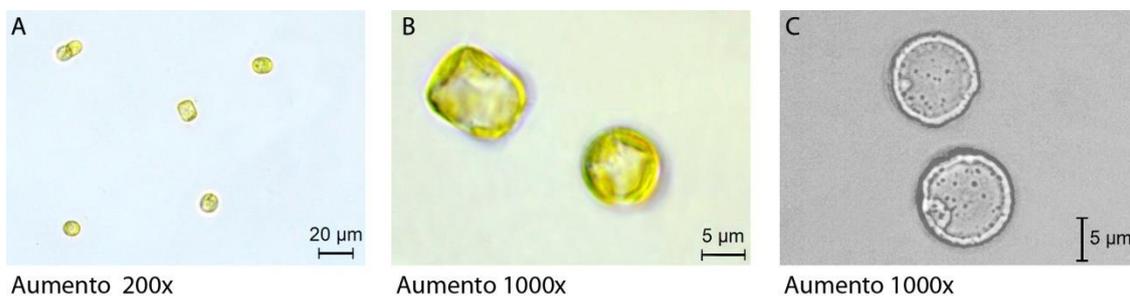
*Thalassiosira* Cleve, 1873.

É um gênero grande com a maioria das espécies marinhas, algumas foram registradas em água doce. Possui numerosas espécies bem representadas nas regiões tropicais, subtropicais, temperadas e polares (PRASAD; FRYXELL; LIVINGSTON, 1993; ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990). Apresentam células discóides a cilíndricas, solitárias ou unidas por fios ou conexões entre as valvas formando cadeias, ou massas mucilaginosas. Valva circular. Aréolas normalmente com lóculos dispostos em linhas radiais, tangenciais ou em arcos, variando em tamanho e proeminência. Espécies dentro do gênero são diferenciadas com base no arranjo e densidade da aréola e do tipo, posição e disposição dos processos frustulares (JOHANSEN; FRYXELL, 1985; ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990; TORGAN; SANTOS, 2008)

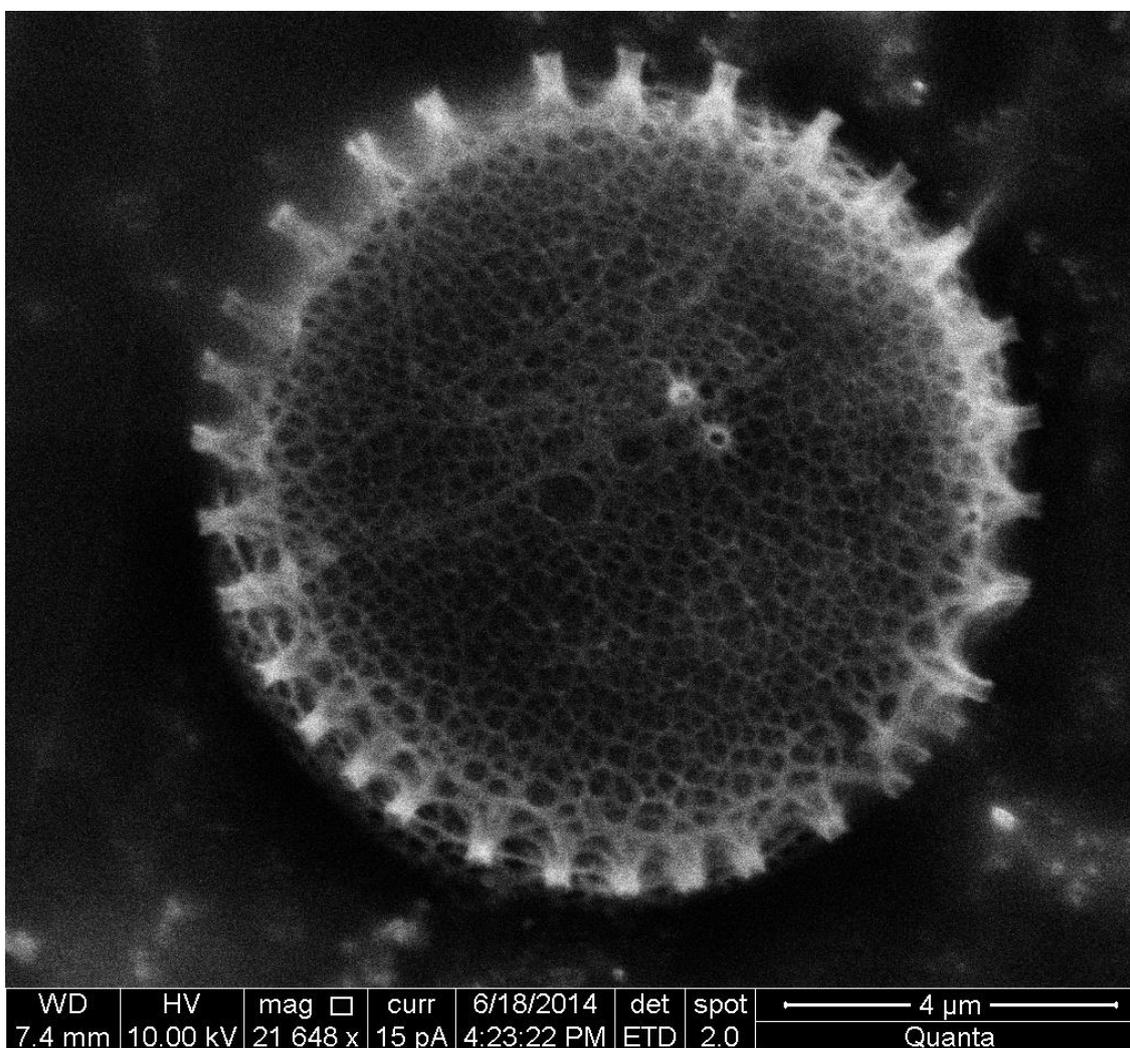
#### A. *Thalassiosira minima* Gaarder, 1951 (M10C)

**Descrição:** Apresenta simetria radial com formato discoide-cilíndrico. Encontrada em células solitárias. Numerosos processos são observados na face valvar externa. Dois processos tubulares característicos na porção central (*strutted process*) (Figura 10), numerosos processos tubulares e um processo labiado na porção marginal. Coloração marrom-dourada. Diâmetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$  (Figura 9 A-C e 10).

**Figura 8 – Fotografias em microscópio óptico da cepa M10C (*Thalassiosira minima*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea**



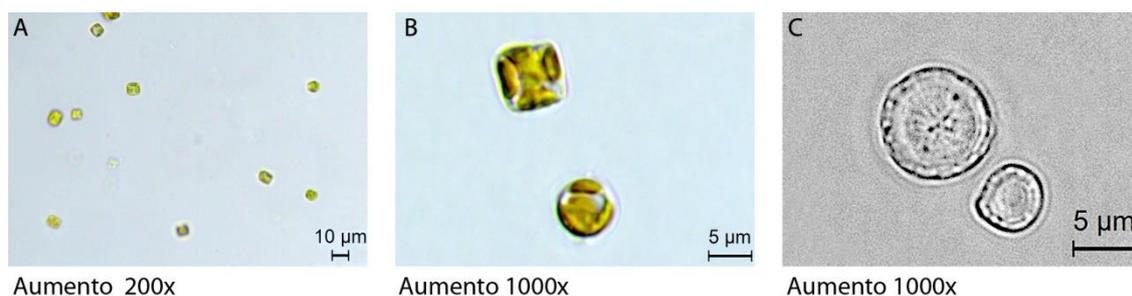
**Figura 9– Fotografias em microscópio eletrônico de varredura da cepa M10C (*Thalassiosira minima*) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB.**



## B. *Thalassiosira* sp.(M17C)

**Descrição:** Apresenta simetria radial com formato discoide-cilíndrico. Encontrada em células solitárias. Coloração marrom-dourada. Aréolas e processos frustulares de difícil visualização em microscopia óptica. Diâmetro de 4 a 9  $\mu\text{m}$  (Figura 11 A-C).

**Figura 10**– Fotografias em microscópio óptico da cepa M17C (*Thalassiosira* sp.) cultivada e mantida no banco de microalgas da UFPB. A e B – diatomáceas vivas. C – frústula da diatomácea



### 5.3 Dados dos cultivos

Os dados de cultivo das 8 cepas estão evidenciados na Tabela 4. A maior e menor média da velocidade de crescimento foi constatado na cepa M7C (*Navicula* sp. cf. *N. perminuta*) e na M19C (*Amphoras* sp.) apresentando, respectivamente,  $1,79 \pm 1,19$  e  $0,32 \pm 0,18$  divisões por dia. A cepa M1C (*Entomoneis alata*) teve a mais duradoura fase exponencial de crescimento (fase Log) encerrando 11 dias, em contrapartida a fase Log mais rápida foi apresentada pelas cepas M7C (*Navicula* sp. cf. *N. perminuta*), com 3 dias, e M17C (*Thalassiosira* sp.) com 4 dias de duração (Tabela 4).

Os maiores rendimento em biomassa seca foram obtidos pelas cepas M56C (*Odontella* cf. *O. longicuris*), M10C (*Thalassiosira minima*) e M17C (*Thalassiosira* sp.) totalizando  $2070$ ,  $1732$  e  $1714$   $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. O menor valor em biomassa,  $224$   $\text{mg.L}^{-1}$ , foi apresentado pela cepa M7C (*Navicula* sp. cf. *N. perminuta*) (Tabela 4).

**Tabela 4— Dados de cultivo em laboratório das 8 cepas de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba, apresentando: velocidade de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial de crescimento em dias (fase Log), total de biomassa seca produzida ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), total de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) ( $\text{mg.g}^{-1}$ ), estimativa de FAMES por litro de cultivo ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).**

Espécie	Cepa	$\mu$ (média)	Duração da fase Log (dias)	Biomassa total ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Total de FAMES ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	Estimativa de FAMES ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<i>Amphora</i> sp.	M19C	0,32±0,18	7	279	134	37,4
<i>Entomoneis alata</i>	M1C	0,67±0,32	11	567	86,9	49,3
<i>Navicula</i> sp 1. cf. <i>N. perminuta</i>	M7C	1,79±1,19	3	224	120,6	27,0
<i>Navicula</i> sp 2cf. <i>N.reinhardtii</i> .	M16C	1,11±0,01	8	494	97,2	48,0
<i>Navicula</i> sp 3.	M27C	0,60±0,05	5	444	107,6	47,8
<i>Odontella</i> sp. cf. <i>O. longicuris</i> .	M56C	0,72±0,40	8	2070	88,4	183,0
<i>Thalassiosira</i> <i>minima</i>	M10C	1,43±0,23	7	1732	71	123,0
<i>Thalassiosira</i> sp.	M17C	0,71±0,32	4	1714	97,2	166,6

A quantidade de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) por grama de biomassa foi maior nas cepas M19C ( $134 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e M7C ( $120,6 \text{ mg.g}^{-1}$ ) mas estimando-se o total de FAMES em  $\text{mg.L}^{-1}$  de cultivo observa-se que essas espécies apresentaram a menor produtividade, com 37,4 e 27,0  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 4). As cepas que apresentaram as maiores estimativas de FAMES por litro de cultivo foram M56C, M17C e M10C, com 183, 166,6 e 123  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Essa relação de produtividade torna-se essencial para a escolha da cepa a ser cultivada em média e larga escala para fins tecnológicos, visto que não é só o teor de FAMES que irá influenciar no rendimento final da produção, mas a capacidade que cada espécie possui em produzir maiores concentrações desses ácidos por unidade de volume. Além disso, a composição e quantidade de ácidos graxos é um ponto chave para a escolha da cepa adequada para o fim que se deseja do cultivo.

### 5.3.1 Análise Cromatográfica Do Perfil De Ácidos Graxos

Os perfis cromatográficos de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) das espécies estudadas (Tabelas 5) mostraram maior diversidade de ácidos graxos nas cepas

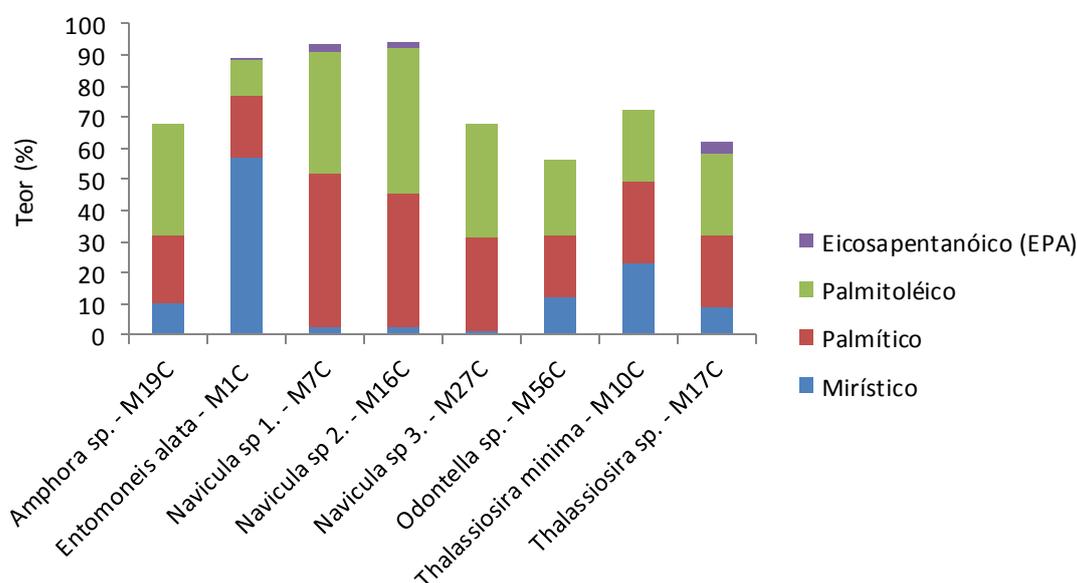
M7C e M17C, totalizando, respectivamente, 26 e 20 do total de 39 diferentes tipos de ácidos graxos encontrados.

**Tabela 5— Diversidade e quantidade (%) de ésteres metílicos dos ácidos graxos das 8 cepas de diatomáceas do estado da Paraíba. Saturação dos ácidos graxos: SFA – saturados, MUFA – monosaturados, DUFA – diinsaturados, TUFA – triinsaturados e PUFA – poliinsaturados.**

Saturação	FAME	Teor (%)							
		M1C	M7C	M10C	M16C	M17C	M19C	M27C	M56C
SFAs	Araquídico	—	0.1	—	—	—	—	—	—
	Behênico	0.2	—	—	—	—	1.2	—	—
	Cáprico	—	0.1	—	—	0.1	—	—	—
	Caprílico	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—
	Capróico	—	0.1	—	—	—	—	—	—
	Esteárico	0.4	0.7	0.9	0.3	0.6	0.5	1	1.5
	Heneicosanóico	—	—	—	—	—	—	11.2	—
	Láurico	0.2	0.1	—	1	12.1	—	—	—
	Lignocérico	1.6	—	—	—	—	—	—	—
	Margárico	—	0.2	—	0.1	—	—	—	—
	Mirístico	57.2	2.5	23.2	2.4	9	10.4	1.3	12.2
	Palmítico	19.5	49.3	26	42.9	23.1	21.7	30.2	19.8
	Pelargônico	—	0.1	—	—	—	—	—	—
	Pentadecílico	0.1	0.5	2	0.6	1	1.8	—	0.6
	Outros	—	—	—	—	0.2	—	—	—
	Tricosanóico	—	—	—	—	—	1.3	—	—
MUFAs	9-Pentadecenóico	—	0.1	0.3	—	0.1	—	—	—
	11-Hexadecenóico	0.5	0.2	—	0.2	0.7	—	—	—
	7-Hexadecenóico	0.2	—	—	—	—	—	—	—
	7-Octadecenóico	0.4	0.7	—	0.1	0.1	0.3	—	—
	9-Heptadecenóico	1.6	0.4	—	—	—	—	—	—
	Erucico	—	—	—	—	—	1.7	—	—
	Gadolêico	—	0.1	—	—	—	—	—	—
	Miristoleico	—	—	1.1	—	—	—	—	—
	Oléico	1.1	0.5	1	0.3	2.3	3.1	3.5	8.1
	Palmitoléico	11.6	38.8	23	46.7	26.3	35.8	36.1	24
Vacênico	1.4	1.3	2.9	0.8	0.6	0.9	1.5	0.3	
DUFAs	7,10-Hexadienóico	2.2	1.1	4.2	0.9	7.7	1.5	1	0.4
	Outros	—	—	—	—	1.6	1.9	1.8	—
	Linoleico	0.3	0.1	—	0.1	0.6	6	7.7	23.9
TUFAs	6,9,12-Hexatrienóico	—	—	13.5	0.7	8.6	—	—	—
	7,10,13-Hexatrienóico	—	—	—	—	—	3.6	2.4	0.9
	C20:3	—	—	—	—	—	1.3	—	0.5
	Gama linolênico	—	0.1	—	—	—	0.5	—	—
	Linolênico	—	0.1	2	0.5	0.8	0.7	1.4	3.2
PUFAs	Araquidônico	—	0.1	—	—	—	6.3	—	2.6
	Octadecatetraenóico	—	0.1	—	0.2	—	—	0.9	—
	Eicosapentaenóico	0.7	2.9	—	2.2	3.9	—	—	—
	Outros	—	—	—	—	0.4	—	—	2.1
Tipo de variedades		18	26	12	17	20	19	13	14

Segundo YING; KANG-SEN; SHI-CHUN (2000) as características dos perfis de ácidos graxos das diatomáceas são facilmente distinguíveis. Foi relatado que quase todas as diatomáceas contêm altas proporções de ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), e eicosapentanoico ou EPA (C20:5) (ORCUTT; PATTERSON, 1975; VOLKMAN et al., 1989; YING; KANG-SEN; SHI-CHUN, 2000). Das cepas estudadas, as maiores concentrações (%) observadas foram para os ácidos palmítico ou palmitoléico com exceção da cepa M1C que apresentou maior teor de ácido mirístico (57,2 %). A quantidade de EPA foi baixa entre as 4 cepas que o apresentaram, tendo a maior quantidade na M17C (3,9%). Estes quatro ácidos representaram de 56 à 94,2% dos ácidos graxos totais das diatomáceas estudadas, com os maiores valores sendo obtido por duas cepas do gênero *Navicula*, a M16C (94,2%) e M7C (93,5%) e pela *Entomoneis alata* (M1C) com 89% (Tabelas 5, Figura 12).

**Figura 11– Gráfico apresentando 4 tipos principais de ácidos graxos obtidos pelas diatomáceas . Percentuais de ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1) e eicosapentanoico-EPA (C20:5) de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba.**



O ácido palmítico é frequentemente utilizado como ingrediente em detergentes, sabões, produtos de limpeza, como surfactante e também em cosméticos para uma variedade de propriedades (ACME-HARDESTY, 2014a). As cepas M7C — *Navicula* sp1.cf. *N. perminuta* — (49,3%) e M16C — *Navicula* sp3 — (42,9%) apresentaram teores de ácido palmítico superiores aos encontrados na palma que é a principal fonte

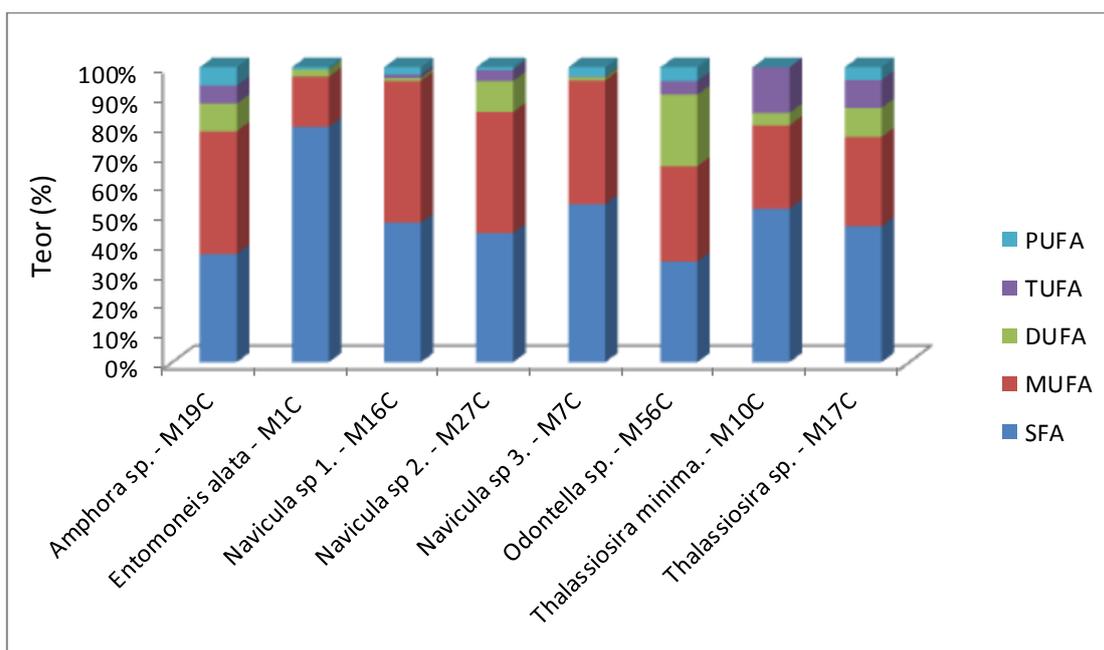
deste ácido possuindo 42,7% (ZAMBIAZI et al., 2007). Em seus trabalhos com diatomáceas marinhas YING; KANG-SEN; SHI-CHUN (2000) reportaram o maior teor de 26,4% para a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*. Chen (2012) obteve maior percentual para a espécie *Nitzschia grossestriata* com 25,1% valor inferior ao encontrado nas 3 cepas do gênero *Navicula* apresentados neste trabalho: M7C (49,3%), M16C (42,9%) e M27C — *Navicula* sp2. cf. *N.reinhardtii* —(30,2%).

O ácido palmitoléico, um ácido graxo essencial (ômega-7), é principalmente utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos, e pode ser encontrado em fontes animais e vegetais, incluindo a noz macadâmia, peixes de água fria e em frutos do espinheiro marítimo, um arbusto do gênero *Hippophae*. Entre estes a maior quantidade de ácido palmitoléico foi encontrado em um genótipo do espinheiro marítimo apresentando 51% (ERCISLI et al., 2008). O maior teor de ácido palmitoléico foi obtido na diatomácea M16C (*Navicula* sp 3.) que apresentou 46,7%. Chen (2012) obteve 19,2% deste ácido com a espécie *Amphora exigua*, este percentual foi superior apenas em relação a cepa M1C (*Entomoneis alata*) que apresentou 11,6%. Ying et al. (2000) obteve 46,3% para a *Nitzschia incerta*, teor semelhante a M16C (46,7%).

O ácido mirístico é utilizado para sintetizar aromatizantes, como ingrediente para produtos químicos, têxteis, alimentos, sabões, detergentes e cosméticos (ACME-HARDESTY, 2014b; DORLAND; ANDERSON; ALBERT, 1999). A cepa M1C (*Entomoneis alata*) apresentou um elevado teor de ácido mirístico (57,2%). As principais fontes de ácido mirístico são encontradas no óleo de coco (18,9%), semente de palma (16,2%) (ZAMBIAZI et al., 2007) e na noz moscada (11%) (ALONSO, 1998). YING; KANG-SEN; SHI-CHUN (2000) apresentou maior valor para a *Nitzschia closterium* com 6,3%; Chen (2012) obteve teor superior em relação as principais fontes deste ácido com a espécie *Chaetoceros muelleri* (77,4%), superando em quase 20% o obtido neste estudo para a M1C.

As quantidades proporcionais de ácidos graxos saturados e insaturados para as cepas estudadas estão apresentadas na Figura 13. O maior teor de ácidos graxos saturados (SFA) foi de 79,3% para a M1C (*Entomoneis alata*), de monosaturados (MUFA) 48,1% para a M16C (*Navicula* sp 2.), de diinsaturados (DUFA) 24,3% para a M56C (*Odontella* sp. cf. *O. longicuris*), de triinsaturados (TUFA) 15,5% para a M10C (*Thalassiosira minima*) e de poliinsaturados (PUFA) 6,3% para a M19C (*Amphora* sp.).

**Figura 12 – Gráfico mostrando as quantidades (%) de FAMEs classificados quanto a saturação nas 8 cepas de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba.**



Visando a produção de biodiesel, a regulamentação nacional não é restritiva mas seguindo a norma EN14214 estabelecida pelo Comitê Europeu de Normalização (Comité Européen de Normalisation - CEN) o limite máximo de teor de ácido linolênico é de 12% e de 1% o teor máximo para os metil ésteres com 4 ou mais insaturações. Para esses padrões de qualidade as cepas M1C, M10C E M27C se enquadram para a produção. Tendo destaque a M10C (*Thalassiosira minima*) por ter apresentado alta velocidade de crescimento ( $1.43 \pm 0.23$  divisões por dia) e alta produtividade de FAMEs por litro de cultivo ( $123 \text{ mg.L}^{-1}$ ), para este estudo.

A quantidade de FAMEs apresentados pelas cepas do mesmo gênero exibiram diferenças nos números totais. Para o gênero *Navicula* as três cepas, M7C, M16C e M27C totalizaram a presença de 26, 17 e 13 ácidos graxos, respectivamente. Entre estas, a quantidade de FAMEs por saturação diferiu apenas para os ácidos graxos com três insaturações (TUFAs) onde a cepa M27C apresentou o teor bem maior que o exibido pelas outras cepas, com 10.5% do total de TUFAs.

Para o gênero *Thalassiosira*, as cepas M10C (*Thalassiosira minima*) e M17C (*Thalassiosira* sp.) apresentaram, respectivamente, 12 e 20 tipos de ácidos graxos. A cepa M10C não apresentou ácidos graxos poliinsaturados com mais de quatro

ligações (PUFAs), para a cepa M17C o teor foi de 4.3%. Tal valor pode ser um indicativo que essas duas cepas tratam-se de espécies diferentes, visto que estão sendo cultivadas sob mesmas condições de cultivo.

## 6 CONCLUSÃO

Um total de 8 cepas de diatomáceas marinhas do estado da Paraíba foram isoladas de distintos habitats e mantidas em culturas monoespecíficas no LARBIM/UFPB, das quais duas foram identificadas em nível de espécie (*Entomoneis alata*, M1C e *Thalassiosira minima*, M10C). Dentre elas tiveram identificação aproximada ao nível de espécies as cepas M7C- *Navicula* sp 1. cf. *N. perminuta*, M16C - *Navicula* sp 2. cf. *N.reinhardti* e M56C- *Odontella* sp.cf. *O. longicuris*. As cepas M17C-*Thalassiosira* sp., M19C-*Amphora* sp., M27C-*Navicula* sp 3 foram identificadas apenas ao nível de gênero. Os representantes do gênero *Navicula* foram isolados de diferentes fontes (água do mar e de tecidos de *Siderastrea* sp.) evidenciando a versatilidade deste gênero em habitar diferentes ambientes.

Sob as mesmas condições de cultivo as cepas apresentaram diferentes respostas, quanto à velocidade de crescimento, rendimento de biomassa, tipos e teores de ácidos graxos. Fato evidenciado também entre as cepas do mesmo gênero.

Os principais ácidos graxos encontrados foram ácido palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1) e mirístico (C14:0), e diferindo de estudos anteriores não houve altos valores de ácido eicosapentanóico - EPA (C20:5) nas diatomáceas marinhas estudadas. Os maiores teores de ácido palmítico foi 49,3% (M7C - *Navicula* sp 1.); ácido palmitoléico foi de 46,7% ( M16C – *Navicula* sp 2); e ácido mirístico foi de 57,2% (M1C – *Entomoneis alata*). Devido a estes altos valores estas cepas mostram-se interessantes para a extração e utilização destes ácidos nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e química.

Para a produção de biodiesel 3 cepas (M1C - *Entomoneis alata*, M7C- *Navicula* sp 1. e M10C – *Thalassiosira minima*) se enquadraram dentro da norma EN14214, porém a M10C foi a que obteve o melhor desempenho, neste trabalho, devido ao seu alto rendimento (123 mg.L<sup>-1</sup>) de FAMES por litro de cultivo e alta velocidade de crescimento (1.43±0.23) . A cepa M7C teve a maior velocidade de crescimento (1.79±1.19 divisões por dia) deste estudo e a segunda maior quantidade (120.6 mg.g<sup>-1</sup>)

de FAMES por grama de biomassa seca, porém obteve o mais baixo rendimento ( $224\text{mg.L}^{-1}$ ) de biomassa por litro de cultivo, apresentando-se como uma cepa interessante para futuros estudos que otimizem o rendimento de biomassa final.

Diante deste estudo pode-se concluir que as cepas que apontam serem mais promissoras não são necessariamente as que produzem maior quantidade de FAMES por grama de biomassa, visto que o rendimento final em biomassa seca por litro pode ser baixo. Os dados obtidos incrementam o conhecimento sobre cultivos de diatomáceas marinhas da Paraíba fornecendo bases para a otimização da velocidade de crescimento, rendimento em biomassa e aumento da produção final de FAMES por litro de cultivo de espécies locais potencialmente importantes para a biotecnologia.

## REFERÊNCIAS

- ACME-HARDESTY. **Palmitic Acid (C16)**. Disponível em: <<http://www.acme-hardesty.com/product/palmitic-acid-c16/>>. Acesso em: 30 jul. 2014a.
- ACME-HARDESTY. **Myristic Acid (C14)**. Disponível em: <<http://www.acme-hardesty.com/product/myristic-acid-c14/>>. Acesso em: 30 jul. 2014b.
- ALGAEBASE. **Entomoneis alata**. Disponível em: <[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=31306](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=31306)>. Acesso em: 30 jul. 2014a.
- ALGAEBASE. **Odontella C.Agardh, 1832: 56**. Disponível em: <[http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=u1397d8bfb4948186&sk=0](http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=u1397d8bfb4948186&sk=0)>. Acesso em: 12 ago. 2014b.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires, Argentina: ISIS Ediciones SRN, 1998.
- ANDERSEN, R. A.; PREISIG, H. R. Historical Review of Algal Culturing Techniques. In: ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. [s.l.] Academic Press Inc, 2005. p. 596.
- ARMBRUST, E. V. The life of diatoms in the world's oceans. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 185–92, 14 maio 2009.
- BEATTIE, A.; HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. the Metabolism of the Chrysophyceae. **Biocham. J.**, p. 531, 1961.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.
- BIANCHINI, R. et al. Microalgae , products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 313–321, abr. 1999.
- BOZARTH, A.; MAIER, U.-G.; ZAUNER, S. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 195–201, fev. 2009.
- CHEN, Y.-C. The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 211–219, mar. 2012.
- CORTÉS, O. E. J. **Biocombustíveis a Partir de Microalgas: Modelagem e Análise de Fotobiorreatores**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2009.

DORLAND, W.; ANDERSON, D. M.; ALBERT, D. M. **Dicionário médico ilustrado Dorland**. 28. ed. São Paulo: Manole: [s.n.].

ERCISLI, S. et al. Comparison of Sea Buckthorn Genotypes ( *Hippophae rhamnoides* L.) Based on RAPD and FAME Data. v. 32, p. 363–368, 2008.

FALKOWSKI, P.; BARBER, R.; SMETACEK, V. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5374, p. 200–7, 10 jul. 1998.

HASLE, G. R.; SYVERTSEN, E. E. Marine diatoms. In: CARMELO R. TOMAS, GRETHE R. HASLE, ERIK E. SYVERTSEN, K. A. S. AND K. T. (Ed.). . **Identifying marine diatoms and dinoflagellates**. San Diego: Aca, 1996. p. 5–386.

JOHANSEN, J. R.; FRYXELL, G. A. The genus *Thalassiosira* (Bacillariophyceae): studies on species occurring south of the Antarctic Convergence Zone. **Phycologia**, v. 24, n. 2, p. 155–179, 1 jun. 1985.

KOCIOLEK, J. P.; SPAULDING, S. A. **Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification**. San Diego, California , USA: Academic Press, 2003.

KOOISTRA, W. H. C. F. et al. The Origin and Evolution of the Diatoms. In: G. FALKOWSKI, PAUL AND H. KNOLL, A. (Ed.). . **Evolution of Primary Producers in the Sea**. [s.l: s.n.]. p. 207–249.

KROTH, P. Molecular biology and the biotechnological potential of diatoms. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 616, p. 23–33, jan. 2007.

LEBEAU, T.; ROBERT, J.-M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: cultivation at various scales. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 6, p. 612–23, fev. 2002.

LEBEAU, T.; ROBERT, J.-M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putative products. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 6, p. 624–32, fev. 2003.

LEE, R. E. Phycology. In: CAMBRIDGE (Ed.). . **Phycology**. 4 edition ed. New York: [s.n.]. p. 369–408.

LOPEZ, P. J. et al. Prospects in diatom research. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 180–6, abr. 2005.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MENEZES, R. S. et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2013.

MÜLLER-MELCHERS, F. C.; FERRANDO, H. J. Técnica para el estudio de las diatomeas. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 7, n. 1-2, p. 151–160, dez. 1956.

ORCUTT, D. M.; PATTERSON, G. W. Sterol, fatty acid and elemental composition of diatoms grown in chemically defined media. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 579–583, abr. 1975.

PRASAD, A. K. S. K.; FRYXELL, G. A.; LIVINGSTON, R. J. The genus *Thalassiosira* (Bacillariophyta): *T. cedarkeyensis*, a new marine benthic diatom from the Florida coast of the Gulf of Mexico. **Phycologia**, v. 32, n. 3, p. 204–212, 1 maio 1993.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. In: **Biologia Vegetal**. 5 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 738.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of Plants**. 8. ed. New York: W.H. Freeman and Company Publishers, 2013.

REVIERS, B. DE. Divisão Ochrophyta. In: **Biologia e filogenia das algas**. 1<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre RS: Editora Artmed, 2006. p. 155–211.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] Blackwell Science, 2004.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. **The Diatoms: Biology & Morphology of the Genera**. [s.l.] Cambridge University Press, 1990.

SALA, S. E.; MAIDANA, N. I. Morphology and Taxonomy of *Amphora Atacamae* Frenguelli (Bacillariophyceae). **Diatom Research**, v. 18, n. 1, p. 69–78, maio 2003.

STEIN, J. **Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements**. Ed. ed. Cambridge [England]: University Press, 1973.

TOLEDO, L.; COMAS, A. Especies de agua dulce de *Navicula* (Bacillariophyceae) de Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 29, p. 171–184, 2008.

TORGAN, L. C.; SANTOS, C. B. DOS. **Ocorrência de *Thalassiosira nodulolineata* (Bacillariophyta) na Laguna dos Patos, Brasil** *Revista Brasileira de Biociências*, 6 fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/606>>. Acesso em: 11 ago. 2014

VOLKMAN, J. K. et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 128, n. 3, p. 219–240, jun. 1989.

WALNE, P. R. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. v. 25, n. 4, p. 53, jan. 1966.

WERNER, D. **The Biology of Diatoms**. v. 13 ed. Berkeley: Blackwell Scientific Publications, 1977.

YING, L.; KANG-SEN, M.; SHI-CHUN, S. Total lipid and fatty acid composition of eight strains of marine diatoms. v. 18, n. 4, p. 345–349, 2000.

ZAMBIAZI, R. U. I. C. et al. Fatty Acid Composition Of Vegetable Oils And Fats. p. 111–120, 2007.