



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



WAGNER GOMES PEREIRA

Efeito da salinidade sobre teor de lipídeos na microalga marinha
Isochrysis galbana para fins biotecnológicos

Rio de Janeiro

2017

WAGNER GOMES PEREIRA

Efeito da salinidade sobre o teor de lipídeos na microalga
marinha *Isochrysis galbana* para fins biotecnológicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade Federal
do Rio de Janeiro como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Químico
com Atribuições Tecnológicas.

Orientadora: Prof^a. Anita Ferreira do Vale

Co-orientador: Prof. Ricardo Moreira Chaloub

Rio de Janeiro

2017

Efeito da salinidade sobre o teor de lipídeos na microalga marinha *Isochrysis galbana*
para fins biotecnológicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovada em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Anita Ferreira do Vale – IQ-UFRJ (Orientadora)

Prof. Ricardo Moreira Chaloub – IQ-UFRJ (Co-orientador)

Prof.^a Lúgia Maria Marino Valente - IQ-UFRJ

MSc. Silvia Pope de Araújo – IQ - UFRJ

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Anita Ferreira do Valle e Ricardo Moreira Chaloub por terem aceitado me orientar em mais um projeto e por me proporcionar a realização deste trabalho. Obrigado pelos conselhos, paciência, ideias, apoio, confiança e amizade.

À todos os meus amigos do LEAF, Silvia, Daniel, Nathania, Graciela, Carlos, Suellen Paula, Marcoaurélio e Victor. Obrigado pela boa convivência. Também aprendi muito com vocês.

À todos os professores do Instituto de Química que me ajudaram a construir o profissional que sou hoje.

Ao Instituto de Química, pela formação, estrutura e bom ambiente.

Aos meus familiares e amigos.

RESUMO

Projeto de Curso

Título: EFEITO DA SALINIDADE SOBRE TEOR DE LIPÍDEOS NA MICROALGA MARINHA *ISOCHRYSIS GALBANA* PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS.

Aluno: Wagner Gomes Pereira

Orientador: Anita Ferreira do Vale – IQ-UFRJ

Co-orientador: Ricardo Moreira Chaloub – IQ-UFRJ

O óleo obtido a partir da biomassa das microalgas é de grande interesse comercial visto que elas são capazes de produzir grandes quantidades, quando comparadas às oleaginosas convencionais. Algumas espécies apresentam altos teores de lipídios (de 20 a 50% do peso seco), podendo, então, ser utilizadas como matéria prima em diversos setores industriais. Desta forma, o conteúdo em lipídeos de algumas microalgas pode ser aumentado significativamente em função de estresses decorrentes das condições de cultivo, como, por exemplo luz, salinidade, temperatura e limitação de nutrientes. O objetivo principal deste trabalho consistiu no estudo do efeito do estresse salino sobre o teor de lipídeos em *I. galbana*. Com este propósito, determinou-se a taxa específica de crescimento, o rendimento celular final, bem como a produção de lipídeos (neutros, polares e totais) nesta microalga marinha em função da salinidade do meio de cultura em células aclimatadas e não aclimatadas a diferentes valores de salinidade. A microalga foi cultivada a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio f/2, sob irradiância de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 12h. Cada experimento foi iniciado pela adi\u00e7\u00e3o de 5×10^4 c\u00e9lulas/mL de meio de cultura com salinidade compreendida entre 40 e 60‰, sendo a salinidade controle de 35‰. O aumento da salinidade foi obtido pela adi\u00e7\u00e3o de NaCl \u00e0 \u00e1gua do mar, sendo os experimentos realizados em duas condi\u00e7\u00f5es distintas: estresse salino imediato, resultante da transfer\u00eancia de c\u00e9lulas cultivadas em salinidade controle (35‰) para meio de cultura com salinidade superior, e estresse salino n\u00e3o imediato, estudado em c\u00e9lulas previamente aclimatadas a diferentes salinidades antes das an\u00e1lises. Observou-se que o aumento da salinidade de 35 para 60‰ resultou numa diminui\u00e7\u00e3o do rendimento celular no final do cultivo (de $8,9 \times 10^6$ para $5,6 \times 10^6$ c\u00e9lulas/mL, em m\u00e9dia) e da velocidade espec\u00edfica de crescimento, de 1,02 para $0,82\text{d}^{-1}$. A an\u00e1lise qualitativa do teor lip\u00eddico foi realizada mediante utiliza\u00e7\u00e3o da sonda fluorescente “Nile Red”, que emite m\u00e1ximo de fluoresc\u00eancia na regi\u00e3o de 580 e 628nm ao ligar-se a lip\u00eddeos neutros e polares, respectivamente. O aumento progressivo da salinidade do meio de cultivo causou um aumento da \u00e1rea da curva de fluoresc\u00eancia, indicando um aumento no conte\u00fado lip\u00eddico celular. A an\u00e1lise quantitativa foi realizada por meio de extra\u00e7\u00e3o dos lip\u00eddios utilizando-se solventes org\u00e2nicos. Quando a salinidade foi aumentada de 35 para 60‰, o teor de lip\u00eddios neutros, polares e totais aumentou em 50,06, 20,15 e 44%, respectivamente. Os resultados quantitativos confirmaram os resultados previstos qualitativamente, indicando que a fluoresc\u00eancia se mostrou um bom m\u00e9todo na previs\u00e3o do ac\u00famulo de lip\u00eddios na microalga estudada neste trabalho. Conclu\u00edmos que o estresse salino promoveu um aumento do teor de lip\u00eddeos na microalga marinha *Isochrysis galbana*.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Visão geral da estrutura química dos representantes mais comuns de sete classes de lipídeos: a) Triacilglicerídeo; b) Diacilglicerídeo; c) monoacilglicerídeo; d) fosfolipídeo; e) esterol; f) sulfolipídeos; g) glicolipídeos; h) Carotenóides. (Greenwell *et al.*, 2009)..... 15
- Figura 2:** Imagem da microalga marinha *Isochrysis galbana* modificada de Mikrotax..... 20
- Figura 3:** Crescimento fotoautotrófico de *Isochrysis galbana* a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob irradiância de $50\mu\text{mols f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em meio f/2 contendo diferentes salinidades. Cada curva representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrão para células não aclimatadas. Os inóculos foram constituídos por células crescidas na salinidade de 35‰..... 28
- Figura 4:** Crescimento fotoautotrófico de *Isochrysis galbana*, aclimatada às diferentes salinidades a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob irradiância de $50\mu\text{mols f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em meio f/2. Cada curva representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrão para células não aclimatadas..... 29
- Figura 5:** Espectro de emissão de fluorescência de *I. galbana* na fase estacionária de crescimento (14^o dia) na presença de diferentes salinidades. Os inóculos foram realizados com células provenientes de cultivo em 35‰. Exceto para o espectro representado em amarelo, as células foram incubadas por 5 minutos com $0,25\mu\text{g/mL}$ (concentração final) de solução de NR. O máximo de emissão da clorofila é visualizado em 680nm, enquanto que o máximo de emissão referente aos lipídeos neutros estão em 580nm..... 32
- Figura 6:** Espectro de emissão de fluorescência de *I. galbana* na fase estacionária de crescimento (14^o dia) na presença de diferentes salinidades, para células previamente aclimatadas. Exceto para o espectro representado em amarelo, as células foram incubadas por 5 minutos com $0,25\mu\text{g/mL}$ (concentração final) de solução de NR. O máximo de emissão da clorofila é visualizado em 680nm, enquanto que o máximo de emissão referente aos lipídeos neutros estão em 580nm..... 33
- Figura 7:** Espectro de emissão de fluorescência de *I. galbana* na fase estacionária de crescimento (14^o dia) na presença de diferentes salinidades. Os inóculos foram realizados com células provenientes de cultivo em 35‰. As células foram incubadas por 5 minutos com $0,25\mu\text{g/mL}$ (concentração final) de solução de NR. O máximo de fluorescência da

clorifila é visualizado em 675nm, enquanto que o máximo referente aos lipídeos polares estão em 630nm.....36

Figura 8: Espectro de emissão de fluorescência na fase estacionária de crescimento (14º dia) para as células aclimatadas coradas com 0,25µg/mL de solução de NR. O máximo de emissão da clorifila é visualizado em 675nm, enquanto que o máximo referente aos lipídeos polares estão em 630nm.....37

Figura 9: Teor de lipídeos neutros na biomassa seca de *I. galbana*, cultivada por 14 dias em meio f/2 e 50µmols fótons.m⁻².s⁻¹ a 20 ± 2°C, em salinidade de 35, 50 e 60‰. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.....41

Figura 10: Comparação do aumento no teor de lipídeos neutros em células aclimatadas, entre as análises qualitativas (coluna cinza) e as análises quantitativas (coluna escura). Cada coluna representa a média entre três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.....41

Figura 11: Teor de lipídeos polares na biomassa seca de *I. galbana*, cultivada por 14 dias em meio f/2 e 50µmols fótons.m⁻².s⁻¹ a 20 ± 2°C, em salinidade de 35, 50 e 60‰. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.....43

Figura 12: Comparação do aumento no teor de lipídeos polares em células aclimatadas, entre as análises qualitativas (coluna cinza) e as análises quantitativas (coluna escura). Cada coluna representa a média entre três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.....43

Figura 13: Teor de lipídeos totais na biomassa seca de *I. galbana*, cultivada por 14 dias em meio f/2 e 50µmols fótons.m⁻².s⁻¹ a 20 ± 2°C, em salinidade de 35, 50 e 60‰. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.....45

Figura 14: Comparação do aumento no teor de lipídeos totais em células aclimatadas, entre as análises qualitativas (coluna cinza) e as análises quantitativas (coluna escura). Cada coluna representa a média entre três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.....45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Comparação de produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais. (Extraído e modificado de Viegas, 2010).	12
Tabela II: Produtividade de biodiesel entre microalgas e oleaginosas convencionais (extraído e modificado de MATA <i>et al.</i> , 2010).	13
Tabela III: Composição do meio de cultura f/2 (GUILLARD, 1975). Os valores indicam as concentrações finais de cada constituinte do meio de cultura, sendo desprezadas as concentrações de nutrientes inicialmente presentes na água do mar.	21
Tabela IV: Taxa específica de crescimento e rendimento final celular dos cultivos não aclimatados e aclimatados nas diferentes salinidades. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).	30
Tabela V: Comparação entre as áreas e a proporção relativa de fluorescência de lipídeos neutros entre células aclimatadas e não aclimatadas. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).	35
Tabela VI: Comparação entre as áreas e a proporção relativa de fluorescência de lipídeos polares entre células aclimatadas e não aclimatadas. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).	38
Tabela VII: Comparação entre a intensidade e o aumento/diminuição de fluorescência para lipídeos totais entre células aclimatadas e não aclimatadas. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).	39
Tabela VIII: Produtividade dos lipídeos da microalga marinha <i>Isochrysis galbana</i> crescida sob irradiância de $50 \mu\text{mols f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, na fase estacionária do crescimento.	46

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Microalgas.....	10
1.2 Aplicações Econômicas.....	11
1.3 Composição da Biomassa.....	14
1.3.1 Alterações da composição da biomassa e estresse salino.....	16
1.3.2 <i>Isochrysis galbana</i>	18
2. OBJETIVOS.....	19
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	20
3.1 Organismo.....	20
3.2 Manutenção e cultivo.....	20
3.3 Condições de cultivo.....	21
3.3.1 Para análise qualitativa dos lipídios.....	21
3.3.2 Para análise quantitativa dos lipídios.....	22
3.4 Crescimento celular.....	22
3.5 Tratamento com diferentes salinidades.....	23
3.5.1 Curto prazo.....	23
3.5.2 Longo prazo.....	23
3.6 Preparo das amostras.....	23
3.6.1 Para a análise qualitativa dos lipídios.....	23
3.6.2 Para análise quantitativa dos lipídios.....	23
3.7 Padronização do uso do Vermelho do Nilo.....	24
3.8 Análise qualitativa de lipídios nas células aclimatadas e não aclimatadas.....	25
3.9 Análise quantitativa de lipídios nas células aclimatadas e não aclimatadas.....	25
3.9.1 Lipídios totais	25
3.9.2 Lipídios neutros.....	26
3.10 Análises estatísticas.....	26
3.11 Reagentes.....	26

4. RESULTADOS	27
4.1 Crescimento celular	27
4.2 Determinação qualitativa do teor lipídico de <i>I. galbana</i> através da medida da fluorescência na presença da sonda fluorescente NR	30
4.2.1 Lipídios neutros	31
4.2.2 Lipídios polares	35
4.2.3 Lipídios totais	38
4.3 Determinação quantitativa do teor lipídico de <i>I. galbana</i>	39
4.3.1 Lipídios neutros	40
4.3.2 Lipídios polares	42
4.3.3 Lipídios totais	44
4.4 Produtividade de lipídios	46
5. DISCUSSÃO	47
5.1 Crescimento celular	47
5.2 Determinação dos lipídios em <i>Isochrysis galbana</i>	48
5.3 O estresse salino e a produção de lipídios	50
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. Introdução

1.1. Microalgas

As microalgas são organismos fotossintetizantes bastante diversificados. Sob esta designação estão incluídos tanto microrganismos eucarióticos, como por exemplo, as algas verdes, quanto procarióticos, como as cianobactérias (HOEK *et al.*, 1995). Embora existam muitas espécies bentônicas e terrestres, possuem majoritariamente hábito planctônico (LOURENÇO, 2006) e a distribuição cosmopolita de seus representantes exige uma série de especializações morfológicas e metabólicas de acordo com o ambiente que habitam. Apesar de o fitoplâncton corresponder a menos de 1% da biomassa fotossintética, quase metade da produtividade global do planeta são atribuídas a este grupo (THOMAS *et al.*, 2012). Estes organismos desempenham um importante papel na estruturação das cadeias tróficas aquáticas devido as suas altas taxas de produtividade primária, além de serem de extrema importância nos processos de ciclagem de nutrientes. No ambiente aquático, as microalgas são responsáveis pela maior parte da produtividade primária (LOURENÇO & MARQUES JÚNIOR, 2009).

A quantidade exata de espécies de microalgas não é conhecida, mas existe na literatura relatos de que podem ser encontradas alguns milhares de espécies. Essa grande quantidade de espécies propicia uma diversificação da composição bioquímica da biomassa desses organismos, possibilitando uma gama enorme de produtos a serem obtidos das microalgas (PULZ & GROSS, 2004). Quando comparadas com plantas terrestres, as microalgas constituem sistemas biológicos mais eficientes na transformação da energia solar em compostos orgânicos através do processo fotossintético (HUANG *et al.*, 2010; PIENKOS & DARZINS, 2009) e, por serem unicelulares, toda a sua biomassa pode ser utilizada. As algas, de um modo geral, vêm sendo utilizadas há centenas de anos como complemento alimentar, constituinte de rações e de forragem, como fonte de princípios bioativos, fertilizantes e corantes naturais (GUALTERI & BARSANTI, 2006). Além disso, novas áreas foram agregadas a esta lista, como a indústria cosmética e farmacêutica (SCHÖRKEN & KEMPERS, 2009).

1.2. Aplicações econômicas

Uma grande versatilidade de aplicações biotecnológicas pode ser atribuída às microalgas. Na área de bioenergia, as microalgas têm sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos visando a produção dos biocombustíveis (CHISTI, 2007; SINGH & GU, 2010; LI *et al.*, 2015) e outros lipídeos como os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) com alto valor de mercado, como os ômega3 e ômega6 (KOLLER *et al.*, 2014). Os pigmentos constituem outro grupo de biomoléculas com alto valor de mercado que pode ser extraído a partir de microalgas. Eles são considerados como os produtos de maior potencial para o sucesso comercial em um futuro não muito distante (SPOLAORE *et al.*, 2006; FORJÁN LOZANO *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 2007; GRANADO-LORENCIO *et al.*, 2009). As microalgas também têm sido consideradas como promissoras para produção fermentativa de alcoóis, principalmente etanol, em função da composição da parede celular e da capacidade de acumular amido como produto de reserva (LI *et al.*, 2015). Além da utilização da biomassa de microalgas para atender às finalidades descritas, as microalgas ainda podem produzir enzimas, esteróis, vitaminas, como, por exemplo, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, biotina e ácido fólico. Além desses, encontra-se relatada à presença de compostos que atuam na resposta imune, anticancerígenos, anti-inflamatórios e antibióticos (OLAIZOLA, 2003; ABED *et al.*, 2009; PASQUET *et al.*, 2011).

O óleo obtido a partir da biomassa das microalgas é de grande interesse comercial visto que elas são capazes de produzir grandes quantidades, quando comparadas às oleaginosas, como pode ser visto a comparação na Tabela I:

Tabela I: Comparação de produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais. (Extraído e modificado de Viegas, 2010).

Oleaginosa	Óleo (%)	Rend. de óleo (L oleo/ha ano)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172
Maconha (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1307
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1070
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58,700
Microalga (médio teor de óleo)	50	97,800
Microalga (alto teor de óleo)	70	136,900

Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em tanques e fotobiorreatores, em qualquer terreno, inclusive zonas áridas, desta forma não competindo com culturas alimentares, além da questão do desmatamento florestal associado. As microalgas também podem ser cultivadas em qualquer época do ano, em água salgada, salobra ou residual e necessitam de pouco mais que luz e CO₂ para seu cultivo.

Dentre as aplicações para o óleo de microalga, podemos citar a produção de biocombustíveis, como o biodiesel, a partir de triglicerídeos. Os triglicerídeos obtidos das microalgas apresentam uma composição em ácidos graxos (14 a 22 átomos de carbono) semelhante à dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (MATA *et al.*, 2010). O biodiesel é derivado de óleos vegetais ou gordura animal, tendo como principal fonte vegetal as sementes oleaginosas como soja, mamona e canola. O biodiesel de microalgas tem sido alvo de pesquisas há anos (MIAO & WU, 2006; CHISTI, 2008; WU *et al.* 2012), embora a viabilidade da produção em grande escala ainda não tenha sido alcançada. A busca de espécies de microalgas com elevada produtividade de lipídios visando à produção de biodiesel tem orientado pesquisadores a construir bancos de dados de espécies cultivadas em condições distintas (GRIFFITHS & HARRISON, 2009; HU *et al.* 2008). Este interesse parte do princípio de que as altas taxas de crescimento das microalgas resultam em alta produtividade (Tabela 2) e menores áreas requeridas para cultivo.

Tabela II: Produtividade de biodiesel entre microalgas e oleaginosas convencionais(extraído e modificado de MATA *et al.*, 2010).

Fonte Vegetal	% óleo/biomassa	Produtividade de biodiesel (Kg de biodiesel/ha.ano)
Milho	44	152
Cânhamo	13	321
Soja	18	562
Pinhão Manso	28	656
Camelina	42	809
Canola	41	862
Girassol	40	946
Mamona	48	1156
Azeite de Dendê	36	4747
Microalgas (médio teor de óleo)	30	51927
Microalgas (médio teor de óleo)	50	86515
Microalgas (Alto teor de óleo)	70	121104

Outra aplicação importante para o óleo de microalgas está na indústria dos cosméticos. A indústria cosmética visa a substituição de ativos artificiais e sintéticos por produtos renováveis, de baixo impacto ambiental e alto rendimento. As microalgas *Chlorella sp.*, e *Nannochloropsis atomus*, por exemplo, têm sido utilizadas em preparações cosméticas devido ao seu alto teor de lipídeos e também por suas propriedades antioxidantes (PAU LOKE SHOW *et al.*,2017). Algumas indústrias cosméticas já utilizam o óleo de microalgas com a finalidade de promover uma hidratação para a pele utilizando a vantagem de o óleo oferecer uma textura agradável e toque seco (NATURA..., 2015). Esses óleos, por serem ricos em antioxidantes, lipídeos polares (glicolipídeos e fosfolipídeos), ácidos graxos poli-insaturados e pigmentos, podem ser utilizados para outras aplicações dentro desta indústria, por exemplo, na área capilar em substituição aos óleos vegetais comumente utilizados. Além dessas aplicações, a utilização deste bioproduto também apresenta importante inserção como base para indústrias químicas e como óleos comestíveis para a indústria de alimentos (EPPINK *et al.*, 2017).

1.3. Composição da biomassa

Fundamentalmente, a biomassa das microalgas é majoritariamente constituída por biomoléculas como os carboidratos, os lipídeos e as proteínas. A proporção de lipídeos presente nesta biomassa seca varia de 5% a 75%, dependendo da espécie de microalga estudada, sendo que a grande maioria das espécies apresenta o conteúdo em lipídeos em torno de 20 a 50% de lipídeos (METTING, 1996; SPOLAORE et al., 2006). Os lipídeos caracterizam um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (SOLOMONS, 2005). Os lipídeos são um dos principais macronutrientes categorizados geralmente como sendo neutros ou polares. Os lipídeos polares incluem os fosfolipídeos e glicolipídeos (AZEREDO, 2012) e os lipídeos neutros são aqueles que não contêm grupos carregados, isto inclui triacilgliceróis, glicerídeos, carotenóides, esteróis e uma escala limitada dos hidrocarbonetos de alto peso molecular que aparecem naturalmente no óleo de alguns peixes, microalgas e sementes (Hu *et al.*, 2008). Na Figura 1 podem ser observadas algumas estruturas ilustrativas representando os tipos mais comuns de lipídeos encontrados nas microalgas.

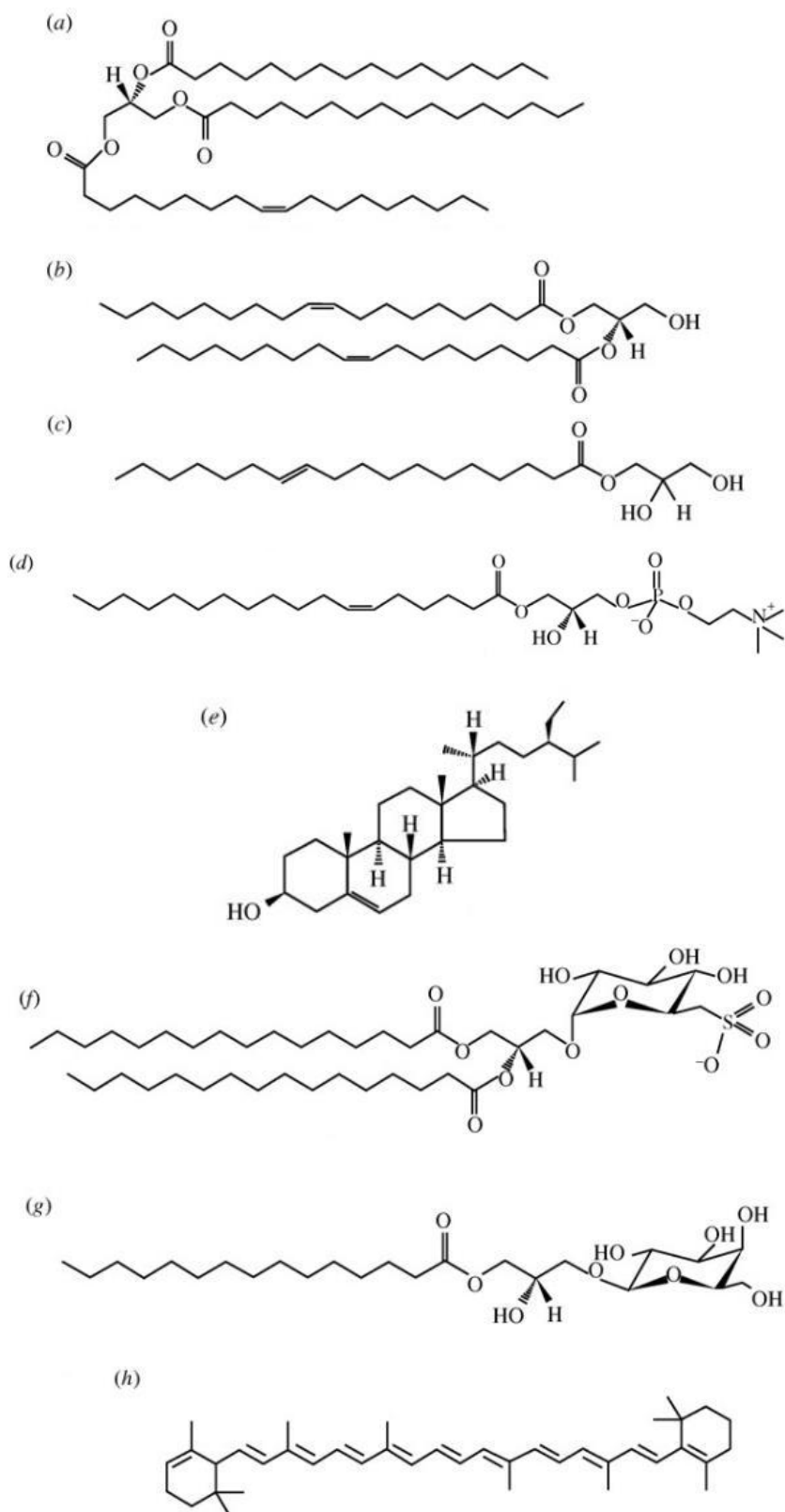


Figura 1: Visão geral da estrutura química dos representantes mais comuns de sete classes de lipídeos: a) Triacilglicerídeo; b) Diacilglicerídeo; c) monoacilglicerídeo; d) fosfolipídeo; e) esterol; f) sulfolipídeos; g) glicolipídeos; h) Carotenóides. (Greenwell *et al.*, 2009)

1.3.1. Alterações da composição da biomassa e estresse salino

As microalgas podem alterar suas rotas metabólicas para sintetizar uma gama de compostos. Diante de sua capacidade de adaptação a diversos ambientes, podem apresentar vários tipos de metabolismos, sendo capazes mudar suas rotas metabólicas como resposta às mudanças das condições ambientais (MATA *et al.*, 2010). Fatores intrínsecos e extrínsecos ao crescimento podem modificar a composição da biomassa algácea em termos de níveis de pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídeos, entre outros (REITAN *et al.*, 1994). Dentre os fatores intrínsecos podem-se destacar a idade da cultura, o tempo de condicionamento das células ao meio de estudo e a interação das células com os nutrientes. Como fatores extrínsecos, são relevantes os efeitos da luz, nutrientes, temperatura e pH. (RICHMOND 1986; HENLEY *et al.*, 2002). O crescimento e a produtividade lipídica da microalga também podem ser influenciados pela salinidade do cultivo (PARIDA & Das, 2005). Além disso, os componentes e o conteúdo de lipídeos das microalgas também podem ser alterados em função das condições de cultivo e, também, de acordo com a espécie estudada (HUANG *et al.*, 2010).

Quando as células são expostas a variações de salinidade, processos específicos como restauração da pressão de turgor, regulação da captura e liberação de íons através da membrana celular e acúmulo de solutos osmoprotetores bem como proteínas relacionadas ao estresse são ativados (TALEBI *et al.*, 2013; ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2000). Estes mecanismos, por sua vez, geram um estresse no interior das células causando um aumento no conteúdo de lipídeos totais que atuam como material de reserva energética até que surjam condições favoráveis (TALEBI *et al.*, 2013; ASULABH *et al.*, 2012).

A salinidade é definida como a medida do total de materiais dissolvidos presente na água do mar. Num senso rigoroso, designar como “sais” o conjunto de substâncias dissolvidas na água do mar é incorreto, uma vez que há componentes não salinos presentes (LOURENÇO, 2006). A salinidade pode variar de acordo com o nível de precipitação/evaporação atmosférica. Por exemplo, águas costeiras, como regiões entremarés ou lagunas rasas, possuem elevada variação de salinidade. Nestas áreas, onde a massa d'água é mais rasa, os efeitos do balanço evaporação/precipitação podem ser percebidos em poucas horas (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002).

A membrana plasmática possui importante papel nas respostas ao estresse salino (KARANDASHOVA & ELANSKAYA, 2005). A ativação osmótica das proteínas de membrana pode ser sinalizada, principalmente, via: (i) alterações na turgência celular; (ii) deformações elásticas da membrana; (iii) estímulo mecânico originado a partir do exo- ou citoesqueleto das células; (iv) alterações nas propriedades físico-químicas da bicamada lipídica das membranas, alterando as forças locais entre molecular lipídicas e entre lipídeos e proteínas (POOLMAN *et al.*, 2002). Na cianobactéria *Synechocystis* sp., o estresse salino promoveu o aumento da insaturação dos lipídeos de membrana, tornando-a mais fluida e reduzindo sua permeabilidade aos íons H⁺ e Na⁺ (JOSET *et al.*, 1996; KARANDASHOVA & ELANSKAYA, 2005), como também aumentou a atividade e a síntese de sistemas antiporte Na⁺/H⁺ (ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2000).

A microalga *Dunaliella salina*, é o principal modelo unicelular eucarioto fototrófico utilizado em estudos de tolerância ao sal (FISHER *et al.*, 1997) devido sua capacidade de aumentar o crescimento da biomassa e o conteúdo de lipídeos sob estresse salino (KALPESH *et al.*, 2012). Esta alga é provavelmente o organismo eucarioto mais halotolerante que se conhece; mesmo não possuindo parede celular, tolera uma ampla variação externa da salinidade (0.05 – 5.0M NaCl), mantendo uma baixa concentração intracelular de íons Na, através de inúmeros mecanismos: (1) retraindo-se ou inchando-se imediatamente; (2) sintetizando solutos compatíveis (glicerol); (3) mudando a composição da membrana plasmática e controlando o fluxo iônico através dela; e (4) otimizando a captação de CO₂ em face das limitações severas de dióxido de carbono em meio hipersalino, utilizando-se, para tal, da síntese de uma anidrase carbônica associada à membrana plasmática e resistente ao sal (FISHER *et al.*, 1996).

Embora muitas espécies de microalgas, incluindo cepas marinhas heterotróficas, sejam tolerantes a altas variações de salinidade, sua composição química e conteúdo lipídico podem variar com o estresse salino (KALPESH *et al.*, 2012; KIRROLIAA *et al.*, 2011). Quando organismos fotossintéticos são expostos ao estresse salino, ocorre um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados (ASULABH *et al.*, 2012). Por outro lado, o aumento de ácidos graxos saturados e a diminuição dos ácidos graxos insaturados sob alto estresse salino também tem sido reportado (KAN *et al.*, 2012).

1.3.2. *Isochrysis galbana*

A microalga marinha *Isochrysis galbana* foi escolhida para este estudo devido ao seu potencial de produção de biomassa e produtividade de lipídeos (PICARDO, 2012). Esta microalga é classificada como uma microalga marinha, unicelular, flagelada, integrante da classe Prymnesiophyceae, da ordem Isochrysidales e a divisão das Primnesiophytas (FALKOWSKI & RAVEN, 2007).

O grupo das Primnesiophytas é constituído, em sua maioria, por organismos marinhos, embora existam alguns representantes de água doce. Integrando a maior parte do nanoplâncton marinho, constitui cerca de 45% do total do fitoplâncton marinho nas latitudes médias do Atlântico Sul. O grupo em questão apresenta indivíduos unicelulares e formas vegetativas solitárias ou coloniais não flageladas que possuem estágios flagelados em alguma parte do seu ciclo de vida. (LEE, 2008).

Isochrysis galbana é utilizada em aquicultura no mundo todo, por conter grandes quantidades de lipídeos de alto valor comercial, sendo geralmente cultivada como fonte de alimento para maricultura (YOUSEF ALKHAMIS & JIAN G. QIN, 2013). Duas características marcantes desta microalga são o fato de sua composição lipídica poder alcançar até 40% de porcentagem em biomassa seca (MATA *et al.*, 2010) e sua capacidade de alcançar altas taxas de crescimento, podendo até dobrar a biomassa de cultivo em 24 horas (ZHU & LEE, 1997).

Embora vários estudos estejam investigando o impacto da salinidade no crescimento e na composição da biomassa de microalgas marinhas, o efeito do estresse salino no crescimento e na composição da biomassa da microalga marinha *Isochrysis galbana* ainda não é completamente conhecido. Nesse sentido, o desenvolvimento de pesquisas que abordem esse tema se torna necessário, tendo em vista a possibilidade de se utilizar essa espécie para finalidades econômicas e ainda visando o acúmulo de componentes da biomassa como lipídeos para diversos fins biotecnológicos.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do aumento da salinidade, sobre o teor de lipídeos da microalga marinha *Isochrysis galbana*, tendo como propósito:

- ❖ Determinar o efeito do aumento da salinidade sobre o rendimento final celular e a taxa específica máxima de crescimento.
- ❖ Determinar qualitativamente a influência do aumento da salinidade sobre o teor de lipídeos nas células não aclimatadas para diferentes salinidades;
- ❖ Determinar qualitativamente a influência do aumento da salinidade sobre o teor de lipídeos nas células previamente aclimatadas para diferentes salinidades;
- ❖ Quantificar e comparar teor de lipídeos nas células que apresentaram melhor relação entre acúmulo deste componente e rendimento final celular, em função do aumento da salinidade.
- ❖ Determinar e comparar a produtividade de óleo em função do aumento da salinidade.

3. Metodologia Experimental

3.1. Organismo

Utilizou-se neste estudo a microalga marinha *Isochrysis galbana* (figura 2), um biflagelado unicelular, pertencente à divisão das Primnesiophytas. Atualmente, este organismo é parte integrante da Coleção de Microalgas em Cultivo do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ e está catalogada sob o código (LEAF300).

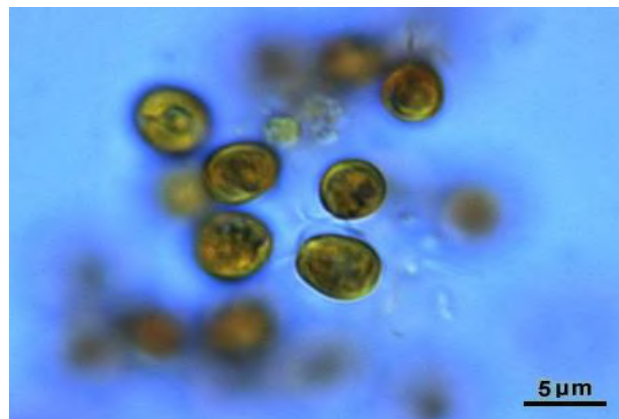


Figura 2: Imagem da microalga marinha *Isochrysis galbana* modificada de *Mkrotax*

3.2. Manutenção e cultivo

O organismo foi mantido e cultivado em meio líquido constituído por água do mar enriquecida com nutrientes inorgânicos e vitaminas, resultando no meio identificado como f/2 (Guillard, 1975) apresentado na Tabela 3. A água do mar foi filtrada, sequencialmente, em papel de filtro (porosidade de 5 μm), em membrana de nitrato de celulose (poro de 0.45 μm MFS®) e em membrana de nitrato de celulose (poro de 0.22 μm MFS®) para remoção, respectivamente, de material em suspensão e contaminantes.

. Após a filtração da água, sua salinidade foi ajustada para 35 ‰ (salinidade média da água do mar), 40, 45, 50 e 60 ‰ pela adição de NaCl à água do mar medida com o auxílio de um refratômetro e em seguida, autoclavada a 121°C por 30 minutos. Após autoclavada, a salinidade da água do mar foi medida e ajustada novamente com água doce (água destilada) autoclavada devido à evaporação da água durante a autoclavação.

As soluções de nutrientes foram preparadas com água destilada e autoclavadas a 121°C por 30 minutos e mantidas em geladeira.

Tabela III: Composição do meio de cultura f/2 (GUILLARD, 1975). Os valores indicam as concentrações finais de cada constituinte do meio de cultura, sendo desprezadas as concentrações de nutrientes inicialmente presentes na água do mar.

Macro nutrientes	µM	-
NaNO ₃	880	-
NaH ₂ PO ₄ .		
2H ₂ O Na ₂ SiO ₃	36,2	-
Metais traço	µM	nM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	11,7	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	11,7	-
CoCl ₂ . 6H ₂ O	-	47
CuSO ₄ . 5H ₂ O	-	40
MnCl ₂ . 4H ₂ O	-	910
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-	26
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	-	75
Vitaminas	-	mg/L
Biotina	-	0,5
Cianocobalamina	-	0,5
Tiamina HCl	-	100,0

3.3. Condições de cultivo

3.3.1. Para a análise qualitativa dos lipídeos

As células foram cultivadas fotoautotroficamente em batelada, utilizando erlenmeyers de 500mL contendo 250mL de meio de cultura, em sala climatizada a 20°C, e fotoperíodo de 12h. Lâmpadas fluorescentes dispostas lateralmente (Sylvania 40W, luz do

dia) foram utilizadas, gerando uma densidade de fluxo de fótons de $50 \mu\text{mol fótons/m}^2/\text{s}$, medida na superfície externa dos frascos por meio de um sensor quântico LI-190B acoplado a um integrador radiométrico LI-250A (Li-Cor Inc.,USA). As culturas foram homogeneizadas através de agitação manual.

3.3.2. Para a análise quantitativa dos lipídeos

As células foram cultivadas fotoautotroficamente em batelada, utilizando carboy de 9L contendo 5L de meio de cultura, em sala climatizada a 20°C , e fotoperíodo de 12h. Lâmpadas fluorescentes dispostas verticalmente (phillips 42W, luz branca) foram utilizadas, gerando uma densidade de fluxo de fótons de $50 \mu\text{mol fótons/m}^2/\text{s}$, medida na superfície externa dos frascos por meio de um sensor quântico LI-190B acoplado a um integrador radiométrico LI-250A (Li-Cor Inc.,USA). As culturas foram aeradas com a mistura atmosférica filtrada através do uso de compressores de ar para aquário(vazão de 3,5L/min), sendo a introdução da mistura gasosa no meio de cultivo realizada por meio de pedras porosas com o propósito de aumentar a superfície de contato entre o meio líquido e o meio gasoso.

3.4. Crescimento celular

A variação da densidade celular foi acompanhada através da contagem do número de células em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, com o auxílio de microscopia óptica (Zeiss, Primo Star). Alíquotas de 3 mL eram retiradas de cada cultivo e preservadas pela adição de $25 \mu\text{L}$ de lugol acético (10 g de I_2 + 10 g de KI em 100 mL de água destilada + 100 mL de ácido acético glacial). Em cada contagem, pelo menos 400 indivíduos foram registrados, multiplicando-se o valor obtido pelo fator correspondente à área de contagem e ao fator de diluição da amostra. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

3.5. Tratamento com diferentes salinidades

3.5.1. Curto prazo

As células cultivadas em meio f/2 com salinidade de 35‰ foram inoculadas em meio de cultivo com salinidade de 40, 45, 50 e 60‰. O crescimento foi iniciado com $5,0 \cdot 10^4$ células/mL e, no 14º dia do cultivo, uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração celular na fase estacionária do crescimento.

3.5.2. Longo prazo

Para a avaliação do estresse salino a longo prazo, as células foram previamente aclimatadas às quatro diferentes salinidades, antes da realização dos experimentos, durante três semanas, pelo menos, sendo repicadas semanalmente.

3.6. Preparo das amostras

3.6.1. Para a análise qualitativa dos lipídeos

As células aclimatadas e não aclimatadas foram cultivadas durante 14 dias. Quando a cultura se encontrava no quarto dia da fase estacionária, uma alíquota de 300µL foi retirada para determinação da concentração celular. A amostra foi diluída até que fosse obtida a concentração celular de 600.000 células/mL, concentração previamente estabelecida.

3.6.2. Para a análise quantitativa dos lipídeos

As células foram coletadas por centrifugação (centrífuga Sorvall, modelo RC5B) durante 10 minutos a 21 °C. A força centrífuga relativa utilizada foi de 10.000g (10 mil vezes a força da gravidade). Em seguida, as células eram lavadas 2x em 20 mL de bicarbonato de amônio (0,5M) para a retirada dos sais presentes na água do mar (ZHU & LEE, 1997; SAUDI-HELIS, 1994). A biomassa foi mantida nos tubos de centrífuga utilizados na centrifugação, e seca em estufa (MedClave, modelo 2) a 70°C até atingir peso constante.

3.7. Padronização do uso de Vermelho do Nilo(NR, do inglês Nile Red) para análise de lipídios

Para que fosse possível a determinação qualitativa do teor de lipídeos na microalga marinha *Isochrysis galbana*, foi preciso previamente fazer a padronização do uso da sonda fluorescente NR levando-se em consideração três aspectos:

1. Concentração celular(cels/mL)
2. Tempo de incubação(minutos)
3. Concentração de Nile Red(μ /mL)

Estes três parâmetros foram analisados para que se obtivesse o melhor valor de trabalho para cada um deles e foram testados para a salinidade de 35 ‰. A concentração celular foi ajustada para 150.000, 300.000, 600.000 e 1.200.000 cels/mL e suas respectivas intensidades de fluorescência, provenientes da clorofila a, que é auto fluorescente, foram analisadas e determinou-se o melhor valor de concentração com base em melhor intensidade de fluorescência e menor ruído conferido ao gráfico.

Para determinar o melhor tempo de incubação, NR sólido foi dissolvido em acetona e introduzido em um bécher contendo uma suspensão celular já em sua melhor concentração. Primeiramente deixou-se a mistura sob agitação por 5 minutos e então 3mL foram introduzidos em uma cubeta de quartzo que foi inserida no espectrofluorímetro, com sua janela regulada para uma abertura de 6nm, e então a intensidade de fluorescência da sonda NR foi medida. A mesma operação foi repetida de três em três minutos para se determinar em qual tempo de incubação a intensidade de fluorescência era a mais intensa. Os tempos de incubação testados foram, em minutos: 5, 8, 11, 14, 17 e 20.

Para a determinação da melhor concentração de NR, preparou-se uma solução de NR em acetona na concentração de 100 μ g/mL. Introduziu-se na cubeta de quartzo uma suspensão celular em sua melhor concentração e a solução de NR de forma que, em cada análise, sua concentração na cubeta fosse, em μ g/mL, de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 e a cubeta foi introduzida no espectrofluorímetro e deixada no escuro com agitação no seu melhor tempo de incubação. Após esse tempo a fluorescência era então medida e dentre as concentrações, aquela que apresentou a melhor intensidade de sinal foi determinada como a melhor concentração de NR. Os melhores resultados encontrados para

concentração celular, tempo de incubação e concentração de NR foram, respectivamente, 600.000 cels/mL, 5 minutos e 0,25 µg/mL.

3.8. Análise qualitativa de lipídeos nas células aclimatadas e não aclimatadas

As células foram incubadas com NR (0,25µg/mL) durante 5 minutos, sob agitação constante e na ausência de luz. Após o período de incubação, a emissão de fluorescência dos lipídeos neutros e polares foi analisada em espectrofluorímetro (modelo QM1; Photon Technology International Inc., USA). Os espectros de emissão de fluorescência do NR solubilizado nos lipídeos neutros foram obtidos na região de 500nm a 750nm, a partir da excitação em 480nm (Z.-Y. Liu et al., 2008), enquanto que a fluorescência da sonda solubilizada nos lipídeos polares foi acompanhada na região de 560nm a 750nm, quando as células foram excitadas em 549nm (ALONZO & MAYZAUD, 1999). Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente utilizando-se fendas de 6nm e tempo de integração 1s. Este procedimento foi realizado para as células cultivadas nas salinidades de 35‰ (controle), 40, 45, 50 e 60‰, tanto para células aclimatadas quanto para as não aclimatadas.

3.9. Análise quantitativa dos lipídeos nas células aclimatadas e não aclimatadas

3.9.1. Lipídeos totais

A obtenção da fração de lipídeos totais foi feita empregando-se a técnica de FOLCH et al., 1957. A biomassa seca das amostras de microalgas foi pesada (100mg), masserada em cadinho de porcelana e transferida para tubo de ensaio, sendo adicionados 5,0mL de metanol. O tubo foi agitado em vortex por 5 minutos. Após este tempo, adicionou-se 10mL de clorofórmio e agitou-se novamente por 10 minutos. A mistura foi então filtrada em papel de filtro, recolhendo-se a solução em proveta graduada com tampa. Foi adicionado uma solução de KCl 0,88% correspondente a ¼ do volume do filtrado. O sistema foi agitado manualmente e, após período de aproximadamente 10 minutos de repouso, a fase superior formada foi removida por aspiração. À solução remanescente foi adicionada uma mistura de metanol:água (2:1, v/v), correspondente a ¼ do volume da solução. Novamente, o sistema foi agitado e mantido em repouso para separação e remoção da fase superior por aspiração. A fase inferior foi filtrada através de

filtros cônicos de papel preenchidos com Na₂SO₄ anidro, sendo, em seguida, lavados por 3 vezes com 1mL de clorofórmio puro. O solvente (clorofórmio) presente no filtrado foi evaporado completamente em estufa a 35°C. A determinação dos lipídeos totais foi realizada por gravimetria, após a completa evaporação do solvente em estufa. Os vidros de relógio, onde foram depositadas as amostras, foram previamente secos em estufa, esfriados em dessecador e pesados em balança analítica até peso constante.

3.9.2. Lipídeos neutros

Para a extração de lipídeos neutros, os cultivos foram realizados em duplicata e a massa seca correspondente a cada cultivo foi reunida e macerada em almofariz. Após transferência para cartuchos de celulose previamente pesados, o conjunto foi novamente pesado em balança analítica e transferido para um sistema de extração tipo Soxhlet (Instituto Adolfo Lutz, 2005). Os balões vazios do sistema de extração foram mantidos em estufa a 105°C até atingirem peso constante e, após a pesagem foram abastecidos com volumes entre 210 e 240 mL de éter de petróleo (faixa de destilação: 30 - 60°C), e o fluxo de condensação do solvente foi mantido em cerca de 120 gotas por minuto (AOCS, 1983). Este processo foi interrompido quando o solvente voltava a se apresentar incolor e os balões contendo o material extraído foram transferidos para banho maria a 60°C com o propósito de evaporar o solvente residual. Em seguida, os balões contendo os lipídeos voltaram para a estufa a 105°C até atingirem peso constante. Dessa forma, a porcentagem de lipídeos neutros foi determinada por gravimetria.

3.10. Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada nas medições realizadas ao longo do tempo, enquanto que o teste t de Student foi aplicado entre as médias obtidas a cada amostragem para os dois tipos de cultivos. Em ambos os casos foi adotado um nível de significância igual a 0,05 (ZAR, 1996).

3.11. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água utilizada nas análises foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, U.S.A.).

4. Resultados

4.1. Crescimento Celular

A Figura 3 representa o crescimento fotoautotrófico de *I. galbana* a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob irradiância de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em meio f/2 e salinidade compreendida entre 35 e 60‰. O in\u00f3culo foi constitu\u00eddo por c\u00e9lulas em fase exponencial, provenientes de um cultivo em meio f/2 com salinidade de 35‰ (c\u00e9lulas n\u00e3o aclimatadas). Pode-se observar que o aumento progressivo da salinidade resultou em uma diminui\u00e7\u00e3o gradual do rendimento final celular e da taxa espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento. Al\u00e9m disso, as salinidades de 50 e 60‰ promoveram, inicialmente, uma redu\u00e7\u00e3o no crescimento, sugerindo a necessidade de uma aclima\u00e7\u00e3o a essas condi\u00e7\u00f5es. Enquanto que a fase exponencial de crescimento, nas salinidades entre 35 e 45‰ come\u00e7a no dia 0 e termina no 4\u00b0 dia de cultivo, nas maiores salinidades a fase exponencial come\u00e7ou no 1\u00b0 dia, terminando a partir do 5\u00b0 dia de crescimento. Para todas as salinidades observou-se uma fase de desacelera\u00e7\u00e3o gradativa at\u00e9 a cultura atingir a fase estacion\u00e1ria entre o 12\u00b0 e o 14\u00b0 dia.

Quando a microalga foi previamente aclimatada \u00e0s salinidades estudadas (Figura 4), o aumento da salinidade resultou, essencialmente, nas mesmas altera\u00e7\u00f5es verificadas em c\u00e9lulas n\u00e3o aclimatadas. Para as c\u00e9lulas aclimatadas, o aumento progressivo da salinidade tamb\u00e9m afetou o crescimento da microalga levando a uma redu\u00e7\u00e3o do rendimento final celular e da taxa espec\u00edfica de crescimento. Entretanto, neste caso, as salinidades de 50 e 60‰ n\u00e3o promoveram uma redu\u00e7\u00e3o inicial do crescimento, indicando que houve aclima\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas \u00e0s novas condi\u00e7\u00f5es. Em todas as salinidades, observou-se um crescimento exponencial durante os 4 primeiros dias de cultivo, seguida de uma desacelera\u00e7\u00e3o gradativa at\u00e9 atingir a fase estacion\u00e1ria entre o 12\u00b0 e 14\u00b0 dia de cultivo.

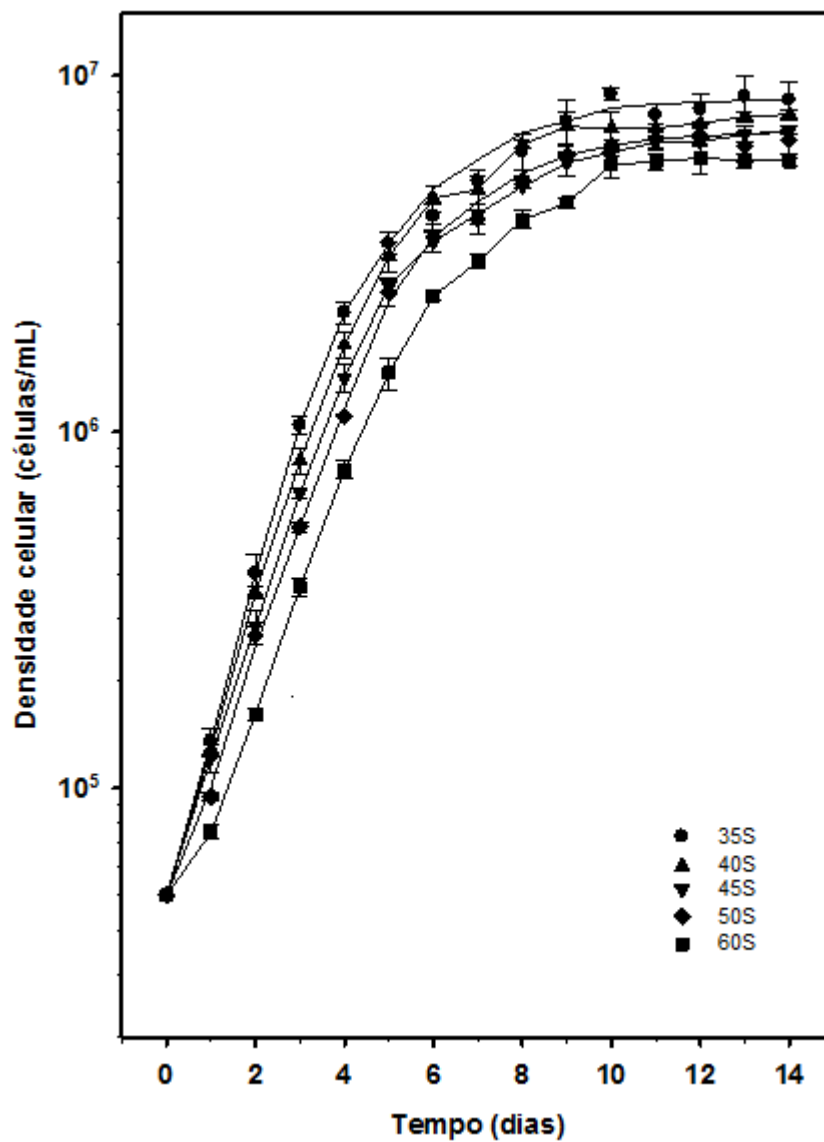


Figura 3: Crescimento fotoautotrófico de *Isochrysis galbana* a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob irradiância de $50\mu\text{mol}\text{ f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em meio $f/2$ contendo diferentes salinidades. Cada curva representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrão para células não aclimatadas. Os in\u00f3culos foram constitu\u00eddos por células crescidas na salinidade de 35%.

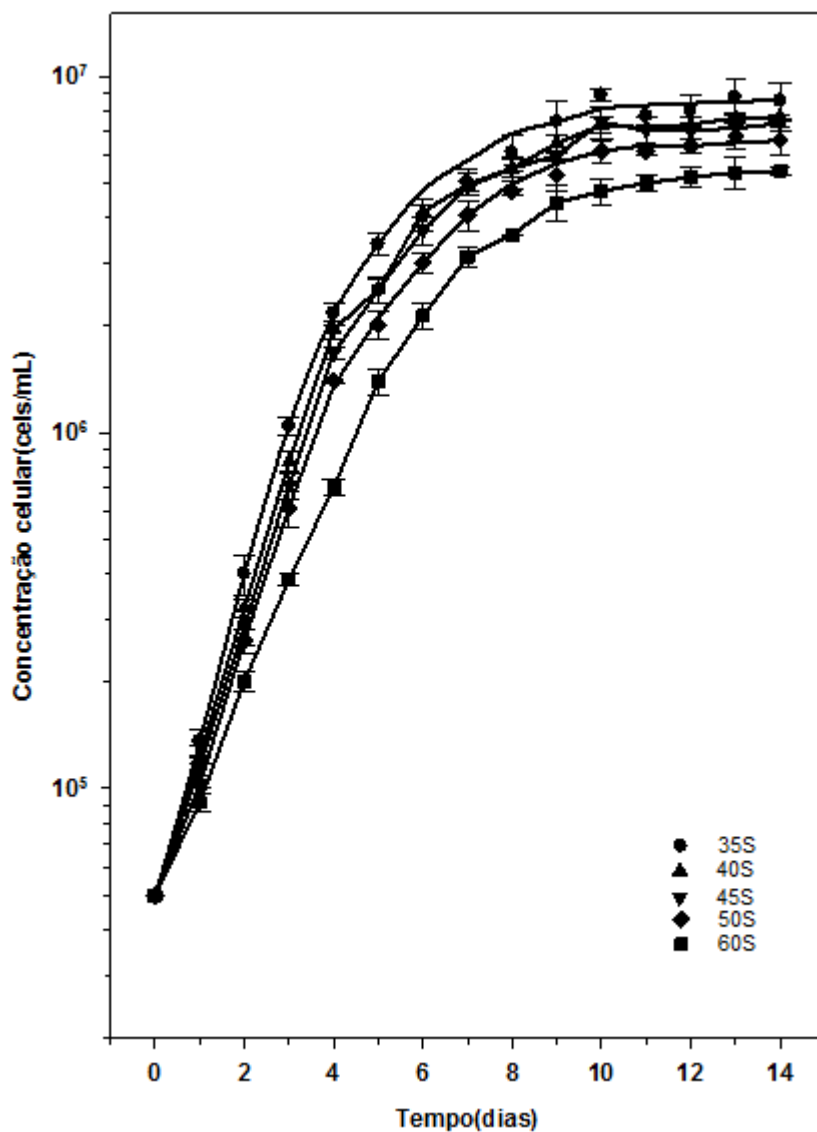


Figura 4: Crescimento fotoautotrófico de *Isochrysis galbana*, aclimatada às diferentes salinidades a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob irradiância de $50 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em meio $f/2$. Cada curva representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrão para células não aclimatadas.

A Tabela IV mostra a influência do aumento da salinidade sobre taxa específica máxima de crescimento e sobre o rendimento final celular dos cultivos previamente aclimatados ou não a salinidades compreendidas entre 35 e 60‰. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no rendimento final celular e na taxa específica de crescimento quando células não aclimatadas são comparadas com células aclimatadas considerando-se uma mesma salinidade, indicando que uma prévia aclimação não interfere nestes fatores. Nota-se uma gradual redução na taxa específica máxima de crescimento em função do aumento progressivo da salinidade, observando-se uma redução de, aproximadamente, 20% quando a salinidade foi aumentada de 35 para 60‰. O mesmo tipo de comportamento pode ser observado para o rendimento final celular, havendo uma redução de 36% quando a salinidade foi aumentada de 35 para 60‰. Vale ressaltar que a diferença entre o rendimento final celular foi significativa ($p<0,05$) quando a salinidade controle foi aumentada para 40‰ e altamente significativa ($p<0,001$) a partir da salinidade de 45‰.

Tabela IV. Taxa específica de crescimento e rendimento final celular dos cultivos não aclimatados e aclimatados nas diferentes salinidades. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p<0,05$).

Salinidade (g/L)	Células não aclimatadas		Células aclimatadas	
	taxa específica de crescimento (d ⁻¹)	rendimento celular final (x10 ⁶ cel./mL)	taxa específica de crescimento (d ⁻¹)	rendimento celular final (x10 ⁶ cel./mL)
35	1,02 ± 0,09 ^a	8,9 ± 0,4 ^a	1,02 ± 0,09 ^a	8,9 ± 0,4 ^a
40	0,95 ± 0,02 ^{a,b}	7,8 ± 0,2 ^b	0,93 ± 0,02 ^b	7,7 ± 0,1 ^b
45	0,89 ± 0,05 ^{b,c}	7,0 ± 0,2 ^{b,c}	0,93 ± 0,02 ^b	7,4 ± 0,4 ^{b,c}
50	0,86 ± 0,04 ^{b,c}	6,6 ± 0,6 ^{c,d}	0,91 ± 0,03 ^b	6,6 ± 0,3 ^c
60	0,82 ± 0,01 ^c	5,7 ± 0,2 ^d	0,83 ± 0,01 ^c	5,4 ± 0,2 ^d

4.2. Determinação qualitativa do teor lipídico de *I. galbana* através da medida da fluorescência na presença da sonda fluorescente NR.

4.2.1. Lipídeos neutros

A Figura 5 apresenta os espectros de emissão de fluorescência, após 5 minutos de incubação com NR (0,25µg/mL, concentração final) das células não aclimatadas às salinidades entre 40 e 60‰, na fase estacionária do crescimento. A emissão da sonda solubilizada em lipídeos neutros (excitação em 480nm) apresentou um máximo em 580nm, enquanto que o máximo de emissão observado 680nm é correspondente à emissão da clorofila, que também ocorre na ausência do NR em decorrência da sua absorção de luz em 480nm (Chen et al., 2010). Verificou-se um aumento progressivo na intensidade de fluorescência, na região de 580nm, em decorrência do aumento da salinidade, indicando um aumento do acúmulo de lipídeos neutros em função da salinidade, sendo que o maior acúmulo foi observado na maior salinidade estudada. A incubação com NR com células aclimatadas às diferentes salinidades resultou em um espectro de emissão de fluorescência (Fig. 6) essencialmente igual ao obtido com células não aclimatadas (Fig. 5).

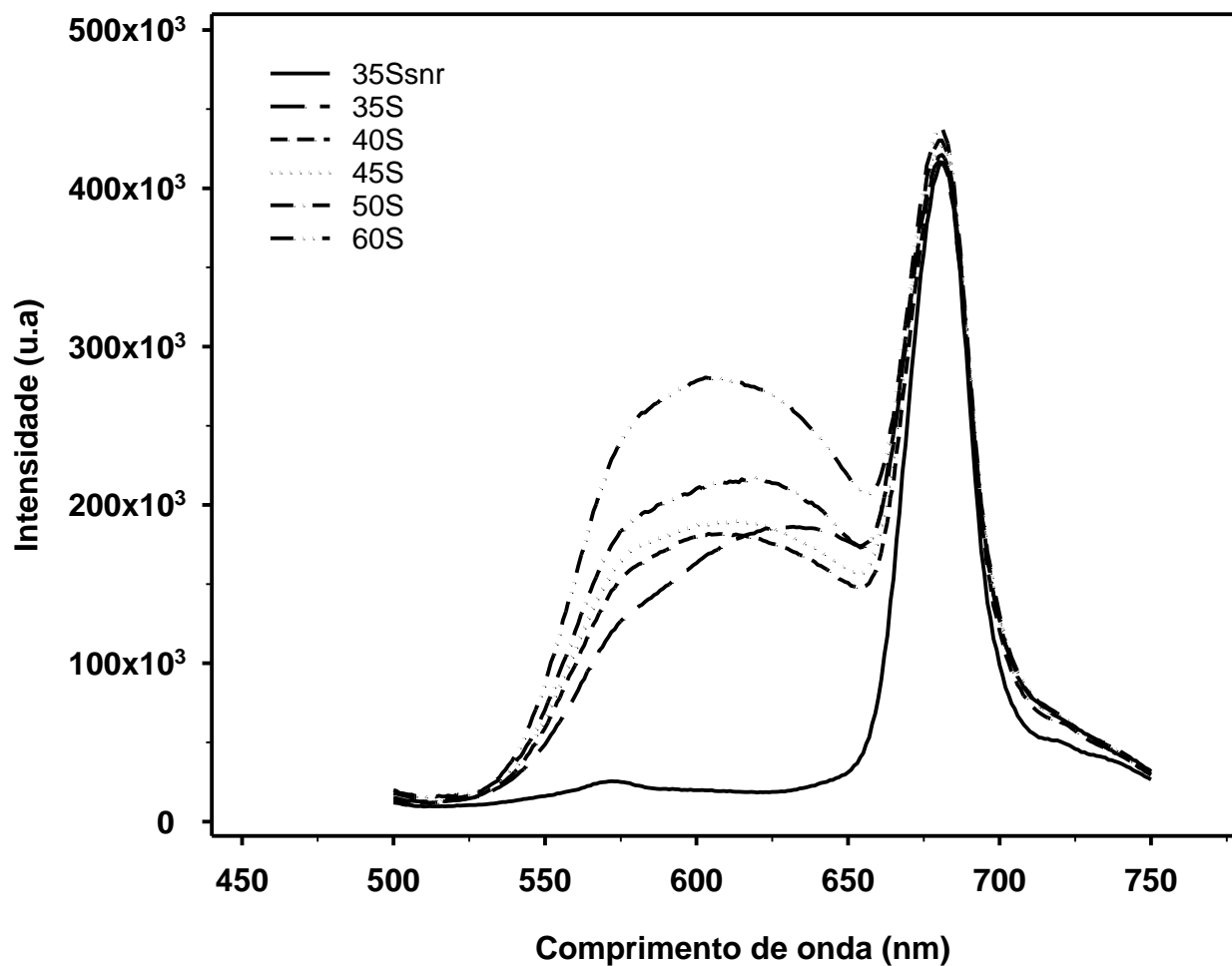


Figura 5: Espectro de emissão de fluorescência de *I. galbana* na fase estacionária de crescimento (14^o dia) na presença de diferentes salinidades. Os inóculos foram realizados com células provenientes de cultivo em 35‰ (não aclimatadas). Exceto para o espectro representado em amarelo, as células foram incubadas por 5 minutos com 0,25µg/mL (concentração final) de solução de NR. O máximo de emissão da clorofila é visualizado em 680nm, enquanto que o máximo de emissão referente aos lipídeos neutros estão em 580nm.

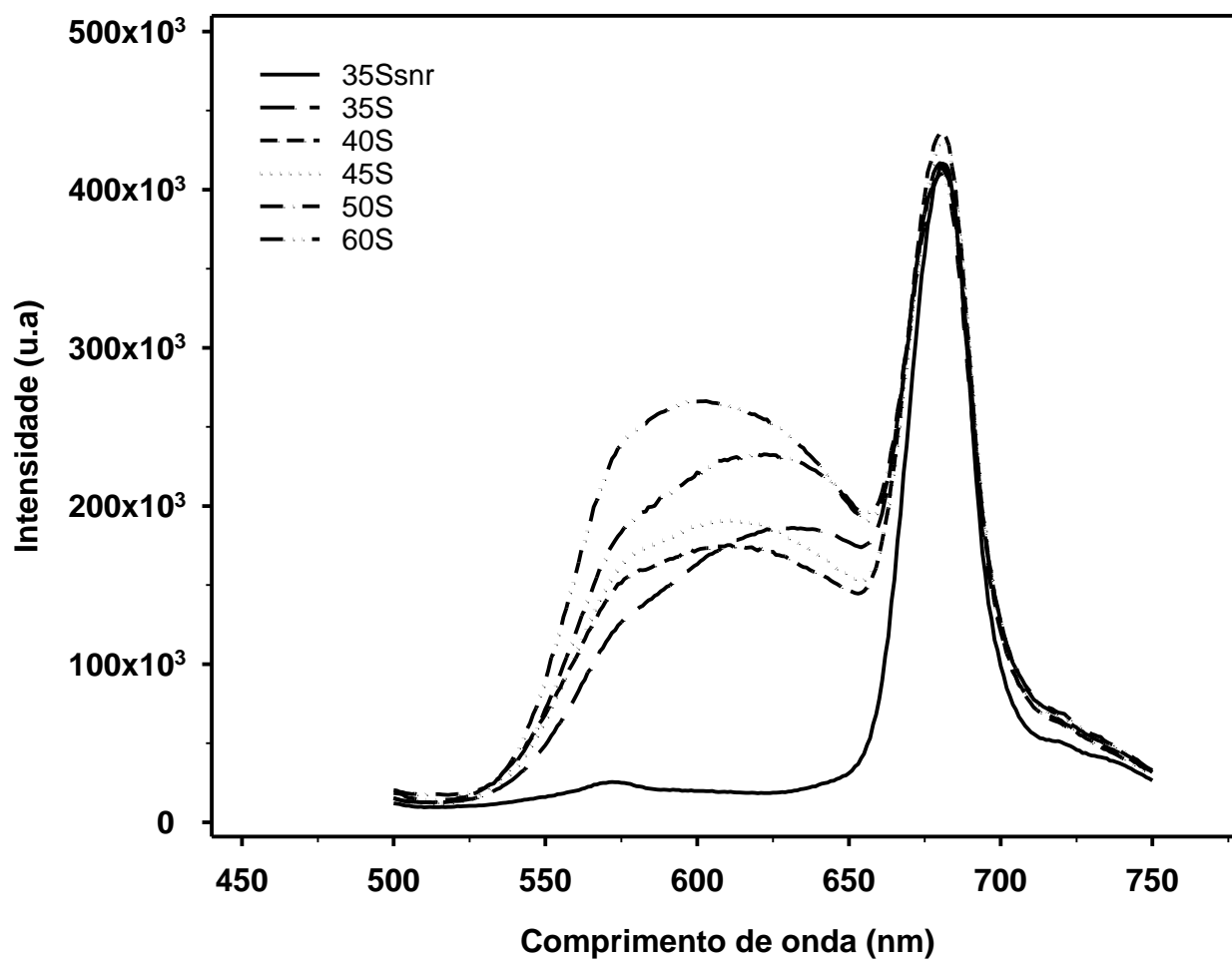


Figura 6: Espectro de emissão de fluorescência de *I. galbana* na fase estacionária de crescimento (14^o dia) na presença de diferentes salinidades, para células previamente aclimatadas. Exceto para o espectro representado em amarelo, as células foram incubadas por 5 minutos com 0,25µg/mL (concentração final) de solução de NR. O máximo de emissão da clorofila é visualizado em 680nm, enquanto que o máximo de emissão referente aos lipídeos neutros estão em 580nm.

A Tabela V mostra uma comparação entre a área sob cada espectro de fluorescência, resultante da integração entre os comprimentos de onda 525nm e 610nm, obtido com células aclimatadas ou não aclimatadas às salinidades na faixa de 35 a 60‰. A área sob cada curva corresponde à população de unidades fluorescentes, que é proporcional à quantidade de lipídeos neutros. Nos casos em que o pico de emissão não é bem definido devido, por exemplo, a alguma interferência da presença dos lipídeos polares, o cálculo da área sob a curva resulta em valores com menores erros associados. O aumento na intensidade de fluorescência entre 525 e 610nm foi altamente significativo ($p < 0,001$) quando comparamos as salinidades 50 e 60‰ com a salinidade controle (35‰), tanto para células aclimatadas quanto para as não aclimatadas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na intensidade de fluorescência nesta região espectral quando a salinidade foi aumentada de 35 para 40‰. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no acúmulo de lipídeos neutros entre células aclimatadas e células não aclimatadas para uma mesma salinidade. Isso indica que, em termos de acúmulo de lipídeos neutros, não há diferença na produção de lipídeos em se aclimatar previamente a célula ou não. Também é possível verificar que houve um aumento de 39 e 75% no acúmulo de lipídeos neutros quando a salinidade foi aumentada para 50 e 60‰, respectivamente, em comparação com a salinidade controle, evidenciando essas salinidades como as mais influenciadoras no acúmulo de lipídeos neutros nas células.

Tabela V: Comparação entre as áreas e a proporção relativa de fluorescência de lipídeos neutros entre células aclimatadas e não aclimatadas. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).

Salinidade (g/L)	Área da curva (integração entre 525 e 610nm) (fótons/s x10 ⁶)		Proporção das áreas em relação à área de 35‰ (%)	
	Células aclimatadas	Células não aclimatadas	Células aclimatadas	Células não aclimatadas
35	8,22 ± 0,11 ^a	8,22±0,11 ^a	-	-
40	9,56 ± 0,19 ^{a,b}	9,51±0,20 ^b	16,36 ± 3,88	15,71 ± 2,61
45	10,05 ± 0,16 ^{b,c}	10,13±0,17 ^b	22,29 ± 3,21	23,26 ± 1,23
50	11,44 ± 0,88 ^c	11,26±0,52 ^c	39,27 ± 12,42	37,11 ± 7,72
60	14,39 ± 1,18 ^d	14,62±0,36 ^d	75,20 ± 15,41	77,89 ± 2,82

4.2.2. Lipídeos polares

A Figura 7 mostra os espectros de emissão de fluorescência, após 5 minutos de incubação com NR (0,25µg/mL) das células não aclimatadas às salinidades estudadas, na fase exponencial do crescimento. Novamente foi possível observar o máximo de emissão da clorofila (680nm), com menor intensidade que anteriormente devido à mudança no comprimento de onda de excitação.

O máximo de emissão observado em 630nm é referente à fluorescência do NR solubilizado nos lipídeos polares (549nm). Quando a salinidade foi aumentada para 50 e 60‰, observou-se um aumento da intensidade no máximo de emissão em 630nm, indicando que essas salinidades promoveram um aumento no acúmulo no teor dos lipídeos polares. A Figura 8 mostra que a utilização de células previamente aclimatadas às diferentes salinidades resultou em espectros de fluorescência essencialmente iguais às obtidas com células não aclimatadas (Fig. 7).

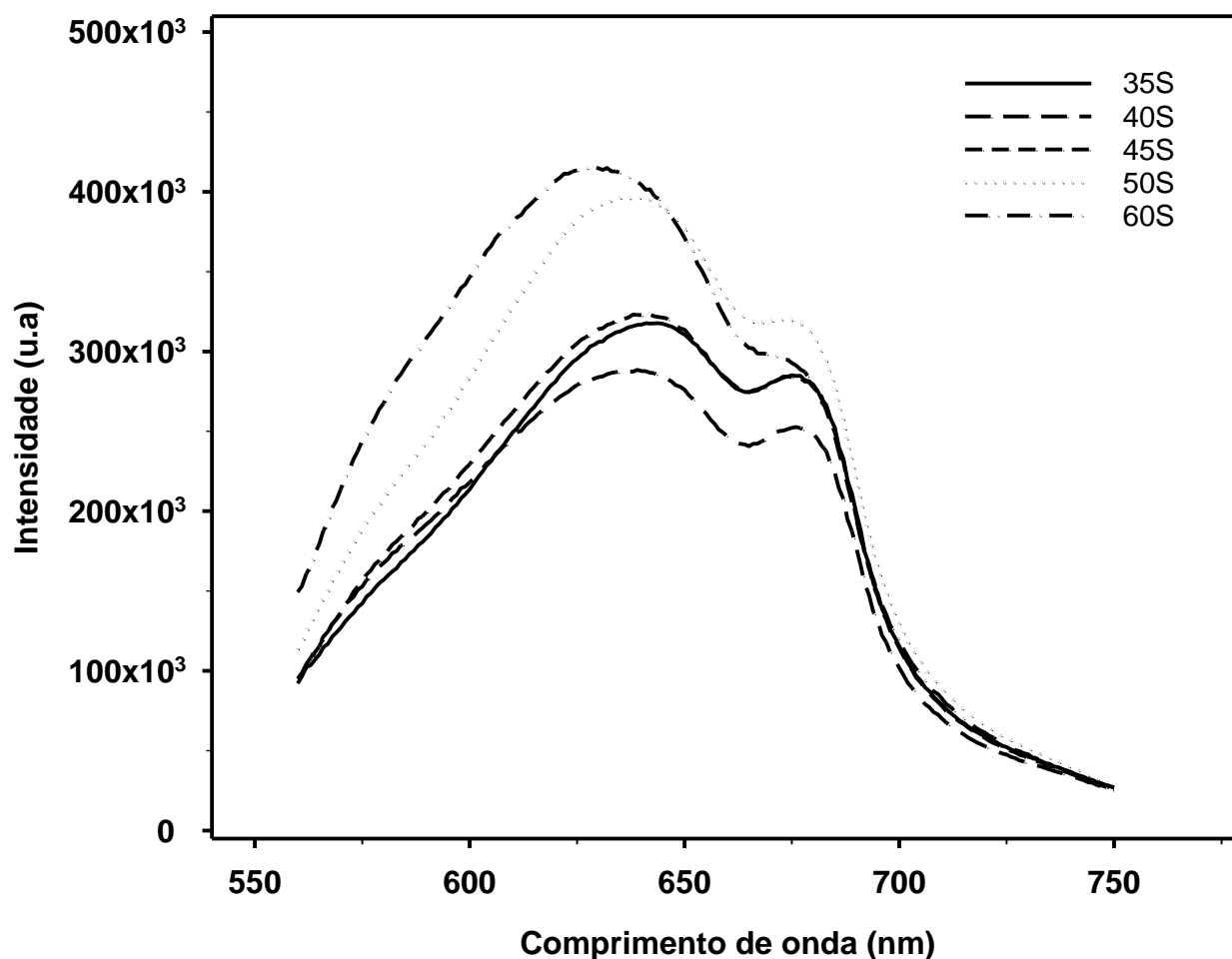


Figura 7: Espectro de emissão de fluorescência de *I. galbana* na fase estacionária de crescimento (14º dia) na presença de diferentes salinidades. Os inóculos foram realizados com células provenientes de cultivo em 35‰ (não aclimatadas). As células foram incubadas por 5 minutos com 0,25µg/mL (concentração final) de solução de NR. O máximo de fluorescência da clorofila é visualizado em 675nm, enquanto que o máximo referente aos lipídeos polares estão em 630nm.

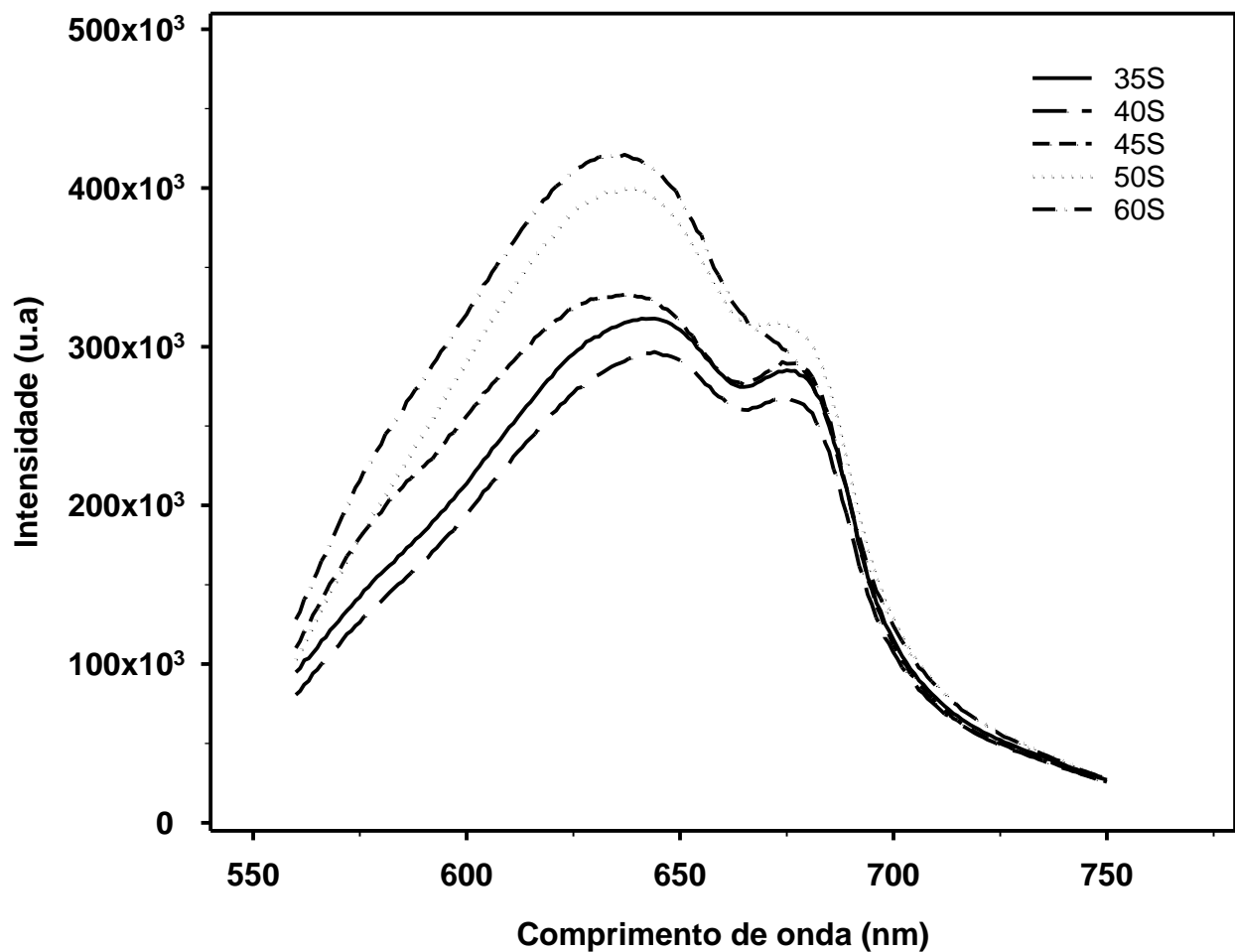


Figura 8: Espectro de emissão de fluorescência na fase estacionária de crescimento (14^o dia) para as células acimatadas coradas com 0,25µg/mL de solução de NR. O máximo de emissão da clorofila é visualizado em 675nm, enquanto que o máximo referente aos lipídeos polares estão em 630nm.

A Tabela VI apresenta uma comparação entre as áreas compreendidas de 600nm a 655nm, de cada curva correspondente à emissão de fluorescência do NR solubilizado nos lipídeos polares presentes nas células cultivadas nas diferentes salinidades. Pode-se observar que a proporção relativa dos lipídeos polares em relação ao conteúdo presente nas células crescidas em 35‰ aumentou, em média, 26,4% e 33,8% quando as células foram cultivadas na salinidade de 50 e de 60‰, respectivamente. Esses resultados foram obtidos independentemente de aclimação prévia às diferentes salinidades.

Tabela VI: Comparação entre as áreas e a proporção relativa de fluorescência de lipídeos polares entre células aclimatadas e não aclimatadas. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).

Salinidade (g/L)	Área da curva (integração entre 600nm e 655nm) (fótons/s x 10 ⁶)		Proporção das áreas em relação à área de 35‰ (%)	
	Células aclimatadas	Células não aclimatadas	Células aclimatadas	Células não aclimatadas
35	18,56 ± 0,06 ^a	18,56 ± 0,06 ^a	-	-
40	17,17 ± 0,73	17,21 ± 0,04	-7,40 ± 3,58	-7,35 ± 0,17
45	19,04 ± 0,00 ^a	19,03 ± 0,00 ^a	2,52 ± 0,42	2,47 ± 0,45
50	23,53 ± 0,88 ^b	23,38 ± 0,54 ^c	26,80 ± 4,77	25,99 ± 2,79
60	24,92 ± 0,58 ^b	24,74 ± 0,48 ^d	34,29 ± 3,38	33,32 ± 2,98

4.2.3. Lipídeos totais

A análise qualitativa de lipídeos totais foi feita de forma indireta, através da soma das áreas obtidas para lipídeos neutros e lipídeos polares uma vez que todo lipídeo da célula equivale à soma de lipídeos polares e neutros. Houve um aumento gradual no acúmulo de lipídeos totais à medida que a salinidade foi aumentada de 35 até 60‰. Em células aclimatadas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no acúmulo de lipídeos totais quando a salinidade foi aumentada para 45‰, mas foi altamente significativa

($p < 0,001$) quando a salinidade foi aumentada para 50‰ e 60‰. O mesmo padrão foi observado em células aclimatadas, sendo seus valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$) aos valores obtidos para células não aclimatadas. Um aumento de 30% e 47% foram obtidos no teor de lipídeos totais quando a salinidade foi aumentada de 35‰ para 50‰ e 60‰ (Tabela VII), respectivamente, indicando que o cultivo dessas duas salinidades resulta em maior acúmulo de lipídeos totais na microalga.

Tabela VII: Comparação entre a intensidade e o aumento/diminuição de fluorescência para lipídeos totais entre células aclimatadas e não aclimatadas. Diferentes letras superescritas em uma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste Fischer $p < 0,05$).

Salinidade (g/L)	Área da curva (integração entre 600nm e 655nm) (fótons/s x 10 ⁶)		Proporção das áreas em relação a área de 35‰ (%)	
	Células aclimatadas	Células não aclimatadas	Células aclimatadas	Células não aclimatadas
35	26,77 ± 0,17 ^a	26,78 ± 0,17 ^a	0.00	0.00
40	26,65 ± 0,54	26,66 ± 0,29	-0,67 ± 1,32	-0,67 ± 0,17
45	29,00 ± 0,05 ^a	29,00 ± 0,03 ^b	8.05 ± 0,56	9,03 ± 0,45
50	34,97 ± 1,66 ^b	34,64 ± 0,04 ^c	30.62 ± 6,70	29,39 ± 2,79
60	39,31 ± 1,67 ^c	39,36 ± 0,14 ^d	46.84 ± 6,68	47,00 ± 2,98

4.3. Determinação quantitativa do teor lipídico de *I. galbana*

A determinação quantitativa dos lipídeos foi realizada apenas nas células cultivadas nas salinidades 35 (controle), 50 e 60‰, tendo em vista o fato de que para lipídeos polares e totais, o aumento para a salinidade de 45‰ não resultou em um aumento significativo quando comparado à salinidade controle, tanto para células aclimatadas quanto para as não aclimatadas. Como não houve diferenças significativas no acúmulo de lipídeos em células aclimatadas e não aclimatadas, optou-se por trabalhar apenas com

células aclimatadas que devido à ausência de uma fase, aonde o crescimento inicial ocorre numa velocidade menor. Todas as análises quantitativas foram realizadas no 14º dia de cultivo, ou seja, na fase estacionária da fase estacionária, no mesmo dia em que as análises qualitativas foram realizadas.

4.3.1. Lipídeos neutros

A Figura 9 mostra que houve um aumento no teor de lipídeos neutros com o aumento da salinidade. O aumento foi extremamente significativo ($p < 0,001$) para todas as salinidades. O teor de lipídeos neutros na salinidade controle foi igual a 16,79% na biomassa seca. Quando a salinidade foi aumentada para 50 e 60‰, o teor de lipídeos neutros foi aumentado para 21,80 e 25,20%, respectivamente. Comparativamente, a Figura 10 apresenta uma relação entre as medidas qualitativas e quantitativas para os teores de lipídeos neutros em função do aumento da salinidade. Esta figura mostra que os resultados obtidos com o uso da sonda fluorescente NR (coluna cinza) foram essencialmente iguais às determinadas gravimetricamente (coluna escura). Quando a salinidade foi aumentada de 35 para 50‰, houve um aumento de 29,85% para a análise quantitativa e um aumento de 39,2% para a análise qualitativa. Quando a salinidade foi aumentada para 60‰, a partir da salinidade controle, houve um aumento de 50,06% para a análise quantitativa e 71,50% para análise qualitativa.

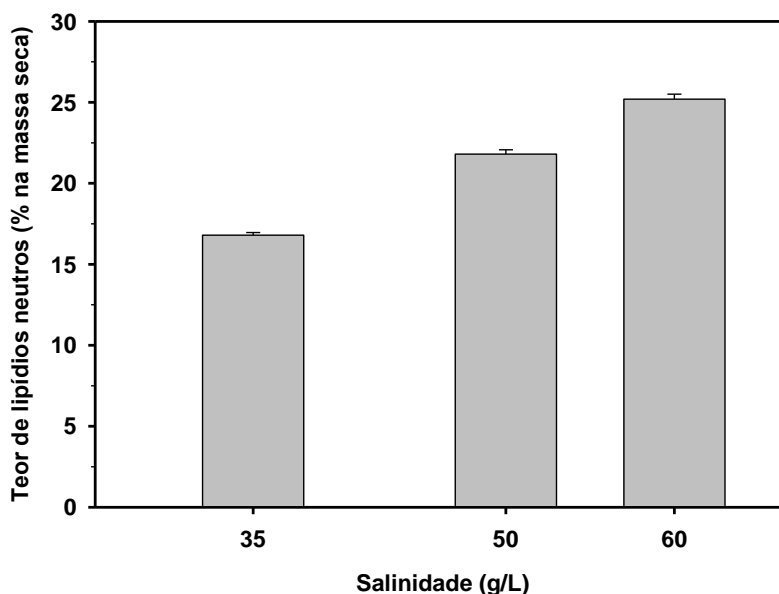


Figura 9: Teor de lipídeos neutros na biomassa seca de *I. galbana*, cultivada por 14 dias em meio f/2 e $50 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, em salinidade de 35, 50 e 60‰. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

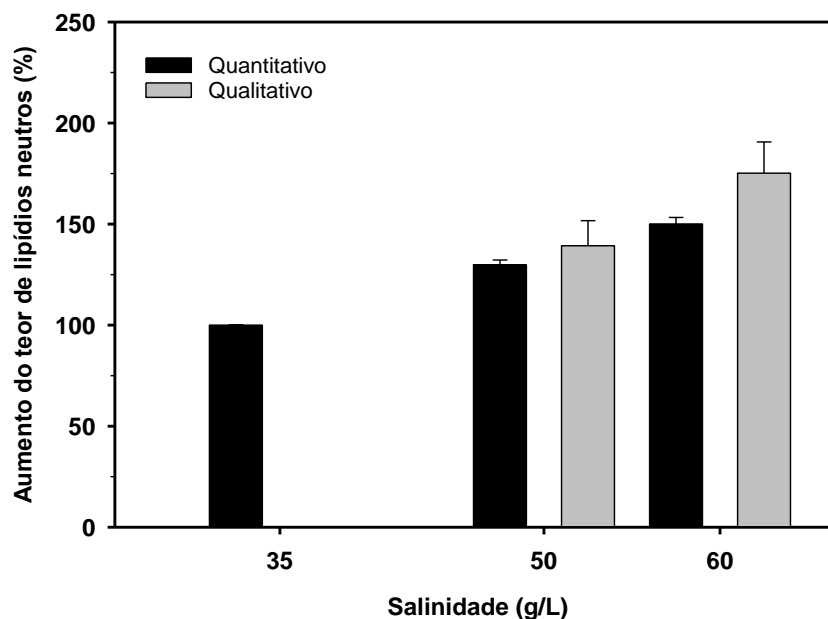


Figura 10: Comparação do aumento no teor de lipídeos neutros em células aclimatadas, entre as análises qualitativas (coluna cinza) e as análises quantitativas (coluna escura). Cada coluna representa a média entre três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

4.3.2. Lipídeos polares

O teor de lipídeos polares foi obtido de forma indireta ao se comparar o teor de lipídeos neutros com o teor de lipídeos totais. Assim, o teor de lipídeos polares foi obtido pela diminuição dos lipídeos totais dos lipídeos neutros. A Figura 11 mostra uma tendência ao aumento do percentual de lipídeos polares com o aumento da salinidade. Entretanto, os valores obtidos foram estatisticamente iguais ($p>0,05$). O teor encontrado para a salinidade controle foi de 3,75%, enquanto que para a salinidade 50‰, o teor encontrado foi de 4,31%. O maior valor foi de 4,40% para a salinidade 60‰. A Figura 12 mostra a comparação no aumento do teor de lipídeos polares, em porcentagem, considerando a análise qualitativa (barra cinza) e a análise quantitativa (barra escura) em função do aumento de salinidade. Quando a salinidade foi aumentada de 35‰ para 50‰, houve um aumento de 18,99% para a análise quantitativa e um aumento de 23,53% para a análise qualitativa. Quando a salinidade foi aumentada para 60‰, o aumento no teor de lipídeos polares foi de 20,15% para a análise quantitativa e de 34,29% para a análise qualitativa. Ao comparar os aumentos entre as análises qualitativa e quantitativa, estes valores são estatisticamente iguais ($p>0,05$), indicando que a análise de fluorescência para determinação do aumento de lipídeos polares se mostrou método confiável e válido para o tipo de célula analisada.

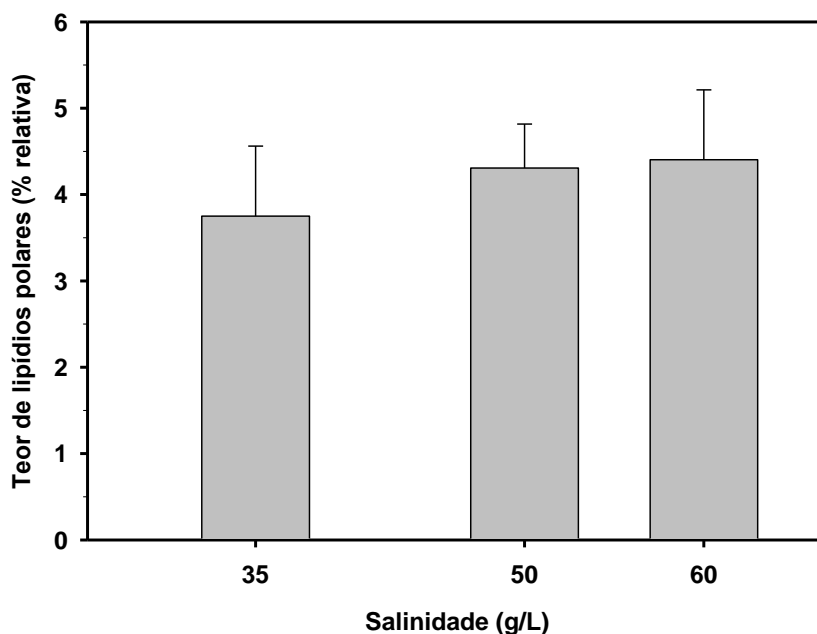


Figura 11: Teor de lipídeos polares na biomassa seca de *I. galbana*, cultivada por 14 dias em meio f/2 e $50\mu\text{mols fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, em salinidade de 35, 50 e 60‰. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

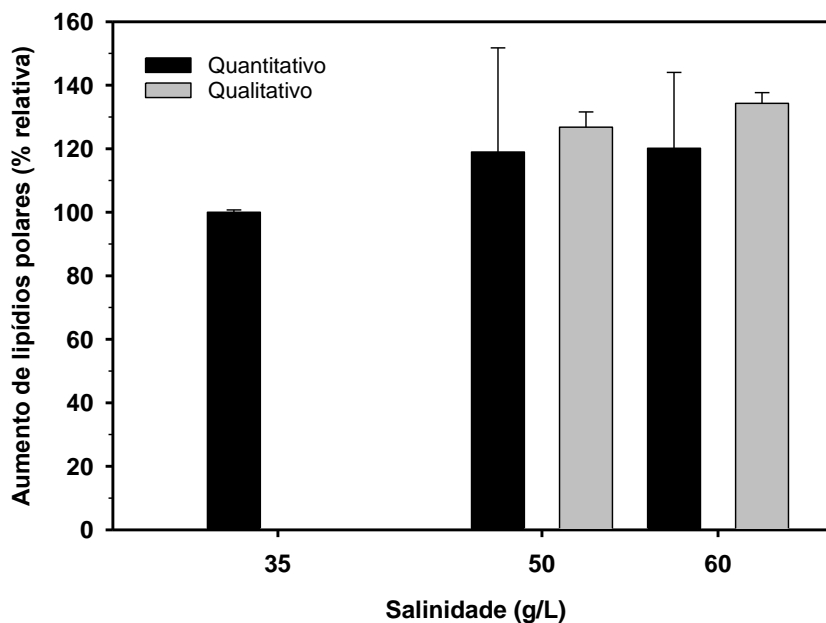


Figura 12: Comparação do aumento no teor de lipídeos polares em células aclimatadas, entre as análises qualitativas (coluna cinza) e as análises quantitativas (coluna escura). Cada coluna representa a média entre três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

4.3.3. Lipídeos totais

A Figura 13 mostra o aumento do teor lipídeos totais na biomassa seca com o aumento da salinidade. Esse aumento foi extremamente significativo ($p < 0,001$) para as salinidades estudadas. O teor de lipídeos totais na salinidade controle correspondeu a 20,54% na massa seca. Quando a salinidade foi aumentada para 50‰, o teor de lipídeos na biomassa seca foi de 26,11%. O maior acúmulo de lipídeos totais foi observado no cultivo em salinidade de 60‰, apresentando um teor de 29,60%. A Figura 14 apresenta uma comparação do aumento no teor de lipídeos totais, estimado qualitativamente pela fluorescência (coluna cinza) com o estimado gravimetricamente (coluna escura) após extração com solventes orgânicos. Houve um aumento de 27,12% quando a salinidade foi aumentada de 35‰ para 50‰ na análise quantitativa enquanto que na análise qualitativa esse aumento foi de 30,62%, sendo estes valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Quando a salinidade foi aumentada de 35‰ para 60‰ o aumento foi de 44% na análise quantitativa e 46,84% na análise qualitativa, também iguais estatisticamente. Estes resultados nos indicam que a análise por fluorimetria se mostrou uma boa metodologia confiável para estimar a variação do teor de lipídeos totais em *I. galbana*.

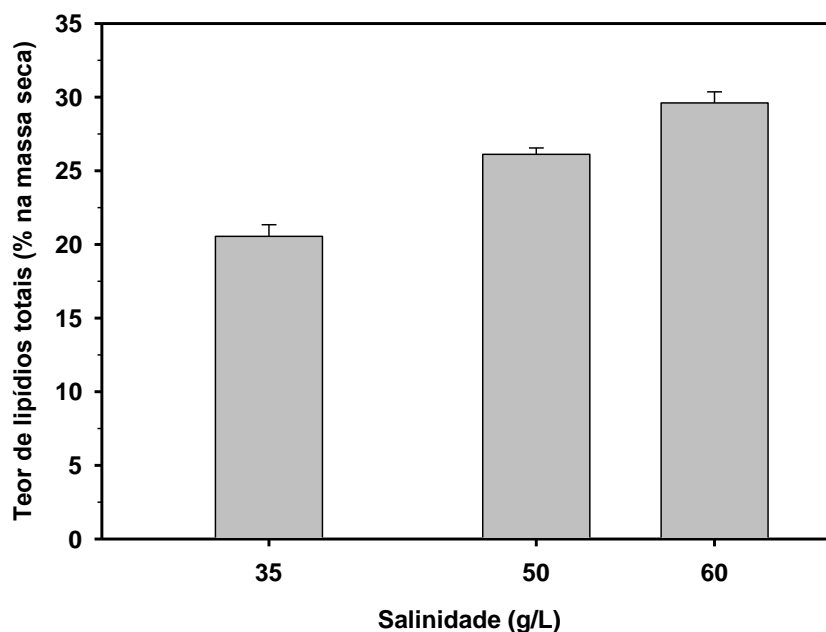


Figura 13: Teor de lipídeos totais na biomassa seca de *I. galbana*, cultivada por 14 dias em meio f/2 e $50\mu\text{mols f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, em salinidade de 35, 50 e 60‰. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

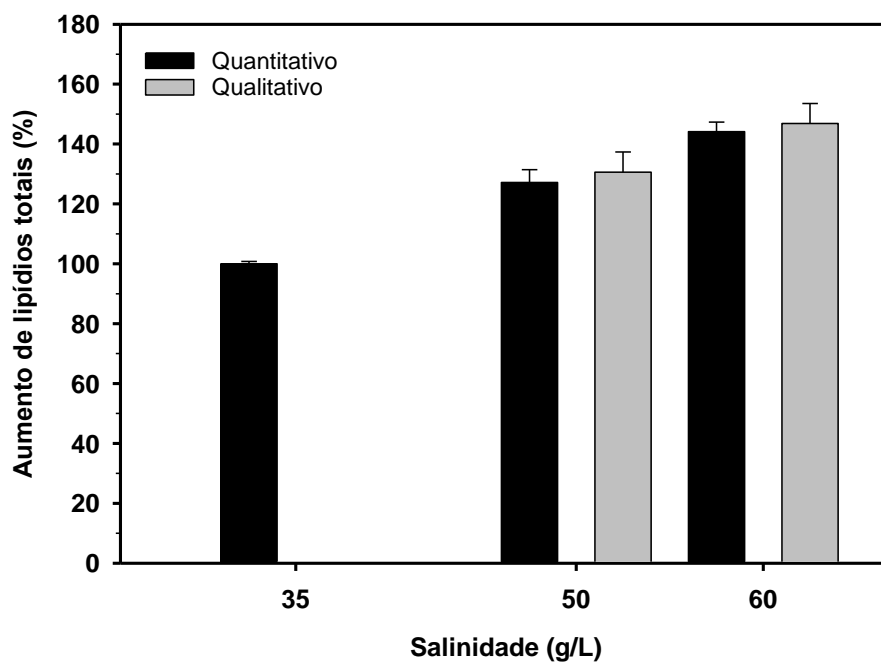


Figura 14: Comparação do aumento no teor de lipídeos totais em células aclimatadas, entre as análises qualitativas (coluna cinza) e as análises quantitativas (coluna escura). Cada coluna representa a média entre três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

4.4. Produtividade em lipídeos

A Tabela VIII mostra a produtividade de lipídeos neutros, lipídeos polares e lipídeos totais com relação ao aumento de salinidade na microalga marinha *I. galbana*. É possível perceber que há uma tendência ao aumento da produtividade de todos os tipos de lipídeos analisados, com o aumento da salinidade. A produtividade de lipídeos neutros foi aumentada em 51,78% quando a salinidade foi aumentada para 60‰ em relação à salinidade controle, enquanto que para lipídeos polares o aumento foi de 96%, considerando-se a mesma relação. Em termos de lipídeos totais, o aumento de produtividade foi de 140,72% quando a salinidade foi aumentada para 60‰ a partir da salinidade controle. Apesar de o rendimento final celular ter sido reduzido em 39,32% quando a salinidade é aumentada de 35 para 60‰, a produtividade de lipídeos é maior para a maior salinidade, indicando que a utilização da salinidade mais alta é vantajosa em termos de produção lipídica.

Tabela VIII: Produtividade dos lipídeos da microalga marinha *Isochrysis galbana* crescida sob irradiância de $50\mu\text{mols f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, na fase estacionária do crescimento.

Salinidade (g/L)	Produtividade		
	Lipídeos neutros (mg/L/d)	Lipídeos polares (mg/L/d)	Lipídeos totais (mg/L/d)
35	2,24 ± 0,1	0,5 ± 0,12	2,75 ± 0,22
50	3,50 ± 0,35	0,69 ± 0,12	4,19 ± 0,46
60	5,64 ± 0,38	0,98 ± 0,05	6,62 ± 0,33

5. Discussão

5.1. Crescimento Celular

O cultivo de *Isochrysis galbana* em meio f/2 apresentou um padrão de desenvolvimento bem definido, com fases de crescimento exponencial, de desaceleração e fase estacionária. Este padrão é observado pois o crescimento é realizado em batelada e, além disso, a quantidade inicial de células (inóculo) otimizou o crescimento resultando no não aparecimento da fase lag e numa renovação adequada. Por outro lado, o cultivo das células em concentrações salinas elevadas resultou num comportamento diferente daquele observado no crescimento controle (35S). De acordo com Bohnert *et al.* (1995), o retardo no crescimento ocorre porque, para que a célula se adapte ao estresse devido ao aumento da concentração salina, ela adota diferentes mecanismos tais como alterações nos padrões morfológicos e de crescimento, fisiológicos e bioquímicos. O reestabelecimento da pressão de turgor desempenha um importante papel no retardo do crescimento, uma vez que o gasto energético sofrido pela célula, na tentativa de manter a pressão de turgor, é muito alto (KIRST, 1989). De acordo com Sudhir & Murthy (2004) e Mahajan & Tuteja (2005), a redução do crescimento de organismos fotossintéticos quando expostos a elevadas concentrações de sal pode ser atribuída a uma superprodução de espécies reativas de oxigênio, que causam estresse oxidativo, inativação de enzimas e redução na taxa fotossintética. Neste trabalho, quando *I. galbana* foi exposta à diferentes concentrações salinas, acima da concentração média da água do mar (35‰), observou-se uma diminuição progressiva do rendimento final celular, que pode estar relacionada ao estresse oxidativo causado pelo aumento da concentração salina.

Avaliando as variações encontradas neste trabalho para a taxa específica de crescimento, Kurpan Nogueira *et al.*, 2015, encontraram valores semelhantes para taxa específica de crescimento e rendimento celular final, quando a mesma cepa foi cultivada na salinidade controle (35‰), considerando-se as mesmas condições de cultivo. A redução da taxa específica de crescimento em função do aumento da salinidade também foi observada por Pancha *et al.*, 2015. Eles observaram que o cultivo de microalgas sob condições de estresse contínuo pode levar a uma redução da taxa de crescimento e a

uma inibição do crescimento. Entretanto, mesmo que haja um impacto negativo no crescimento, o aumento da salinidade pode estimular as células a sintetizarem moléculas que podem apresentar potencial biotecnológico, como, por exemplo, acúmulo de lipídios (HUANG *et al.*, 2010).

Embora o processo de aclimação a diferentes salinidades tenha levado as células a entrarem na fase exponencial do crescimento, logo no primeiro dia do cultivo, não houve diferenças com relação ao rendimento final, com relação às células que não foram aclimatadas. Independente do processo de aclimação, uma redução progressiva da taxa específica máxima de crescimento foi observada em função do aumento da salinidade

5.2. Determinação dos lipídeos em *I. galbana*.

Os primeiros a investigarem a sensibilidade da sonda fluorescente NR na determinação de lipídios neutros foram Greenspan *et al.* (1985). Esta sonda é fortemente fluorescente em ambientes hidrofóbicos, onde o máximo de fluorescência é deslocado para o azul proporcionalmente à hidrofobicidade do ambiente (GREENSPAN *et al.*, 1985; GREENSPAN & FOWLER, 1985). O corante não interage com nenhum outro componente celular além dos lipídios e sua solubilidade e fluorescência são negligenciados em meio aquoso (GREENSPAN & FOWLER, 1985). O NR apresenta seu máximo de fluorescência em comprimentos de onda mais curtos quando ligado aos lipídios neutros, quando comparado à sua emissão quando ligado aos lipídios polares (GREENSPAN & FOWLER, 1985). Para a correta utilização da sonda fluorescente NR, foi feita uma prévia padronização levando-se em conta três parâmetros: concentração celular (cels/mL), tempo de incubação (minutos) e concentração final de NR (μ /mL). Esta padronização está diretamente relacionada à penetração da sonda no interior da célula. O tempo de incubação desempenha papel fundamental nesta padronização, uma vez que este tempo influencia na intensidade de fluorescência. De acordo com Cooksey *et al.*, (1987) o tempo decorrido após a adição de NR antes da medição fluorescente afeta negativamente a qualidade do sinal. A maior intensidade de fluorescência foi observado para o tempo de 5 minutos, sendo que um tempo maior que este causava uma queda na intensidade de fluorescência. A padronização da concentração é necessária para se evitar desvios de linearidade entre a fluorescência e a concentração da amostra em solução. A

fluorescência é proporcional à concentração em amostras diluídas, em outras palavras, quando a absorção é menor que 0,1 (Bernard Valeur, 2001).

Neste trabalho, o máximo da emissão do NR para lipídios neutros que foi observada, não aparece como um pico definido. Isto ocorre, provavelmente, devido a um fator interferente, resultado de um outro máximo de emissão de fluorescência, que ocorre entre 600 e 650nm. Esta interferência pode ser atribuída à emissão de fluorescência dos lipídios polares presentes na célula. Estudos feitos por Alonzo & Mayzaud, 1999, mostraram que não há uma especificidade absoluta na determinação de lipídios neutros, ou seja, a fluorescência de lipídios polares pode ser detectada (emissão máxima entre 610 e 630nm) mesmo nas condições de excitação utilizadas para detecção dos lipídios neutros (excitação/emissão em 480/580nm). Chen *et al.* (2010) também obtiveram um mascaramento do máximo de fluorescência referente aos lipídios neutros devido à interferência dos lipídios polares que apresentavam fluorescência entre 600 e 650nm. O pico referente à emissão de fluorescência da clorofila não se sobrepõe ao pico do NR solubilizado nos lipídios neutros. Dessa forma, essa emissão não se enquadraria num tipo de emissão interferente (GREENSPAN & FOWLER, 1985). Morschett *et al.*, 2016, encontraram resultados semelhantes aos nossos, utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*, entretanto, em seu trabalho, não houve interferência significativa no máximo de emissão de lipídios neutros causado pelos lipídios polares. Isso pode estar relacionado ao fato de estes autores terem utilizado DMSO para facilitar a penetração da sonda fluorescente na célula e alcançar mais facilmente os lipídios neutros. Por outro lado, Alonzo & Mayzaud, 1999, sugeriram que a utilização dos comprimentos de onda de 549 e 628nm para excitação e emissão, respectivamente, de lipídios polares em condições aquosas. Isso poderia reduzir a interferência de lipídios neutros na emissão dos lipídeos polares quando comparado à sua emissão quando registrada num outro par de comprimentos de onda (560/610nm) utilizado em seu trabalho. Entretanto lipídios neutros interferem na emissão de lipídios polares e vice-versa, não havendo especificidade absoluta.

O máximo referente à fluorescência de lipídios polares está deslocado para a região do vermelho (630-640nm) do espectro eletromagnético, quando comparado ao reportado na literatura (628nm). Isso se deve ao fato de que o máximo de emissão da sonda fluorescente NR é sensível às propriedades químicas e físicas dos solventes utilizados. Assim, quanto mais polar o solvente for, mais deslocado para o vermelho será o máximo

da emissão (Greenspan & Fowler, 1985). Elsey *et al.* (2006) mostraram em seu estudo com a microalga *Nannochloropsis* sp., que o máximo de fluorescência do corante NR sofreu um deslocamento de 32nm para o vermelho quando o solvente de solubilização foi substituído de clorofórmio para etanol, sendo este último mais polar. Levando em consideração todos estes fatores, Alonzo & Mayzaud (1999) mostraram que a resposta de fluorescência dos lipídios totais é igual à soma das repostas de fluorescência de lipídios neutros e polares presentes na amostra estudada. Desta forma, a análise qualitativa para lipídios totais neste trabalho foi baseada na soma dessas respostas obtidas para lipídios neutros e polares.

Nem sempre é possível obter uma boa relação entre a análise por fluorescência e a análise gravimétrica dependendo da espécie de microalga estudada. Estudos realizados com a microalga marinha *Nannochloropsis* sp. para avaliar o acúmulo de lipídios na fase estacionária, mostraram que, pelo método tradicional de fluorescência, pareceu não haver acúmulo de lipídios. Entretanto, a análise gravimétrica mostrou que houve um aumento significativo no acúmulo de lipídios (DOAN & OBBARD, 2011). Contrariamente, a microalga *I. galbana* se mostrou uma boa espécie para este tipo estudo, mostrando uma excelente correlação entre as análises de fluorescência e gravimétrica, mesmo sem a utilização de DMSO ou glicerol, como agente facilitador da entrada da sonda fluorescente nas células.

É importante destacar que a interferência da fluorescência dos lipídios polares sobre a fluorescência dos lipídios neutros pode ser contornada através da determinação da área sob a curva de fluorescência entre os comprimentos de onda de 525 e de 610nm.

5.3. O estresse salino e a produção de lipídeos

Os lipídios neutros estão associados com a função de armazenamento de energia na célula (PICARDO, 2012) e o seu acúmulo pode estar relacionado com a preservação da eficiência da divisão celular devido à mudança de baixos níveis para altos níveis de salinidade (AHMED *et al.*, 2017). Desta forma, o acúmulo deste lipídeo pela microalga *I. galbana* poderia estar relacionado a uma tentativa de preservar a eficiência do crescimento, uma vez que foi possível observar que o aumento da salinidade afetou o crescimento celular. Os lipídios polares estão presentes predominantemente na

membrana celular e estão associados à formação estrutural e a funcionalidade da membrana celular (AZEREDO, 2012). A análise dos resultados mostrou que não houve um aumento significativo no teor de lipídios polares e, quando comparado ao teor de lipídios neutros, eles estavam em menor quantidade. Um aumento no teor de lipídios totais na fase estacionária geralmente é devido a um acúmulo no teor de lipídios neutros na forma de triacilgliceróis e não devido aos lipídios polares, como fosfolipídios, localizados na membrana celular (SHEEHAN *et al.*, 1998). Normalmente, quando células são cultivadas até a fase estacionária e sob algum tipo de estresse, os lipídeos neutros são os principais constituintes da célula, na forma de triglicerídeos (ALONSO *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2008). Esse aumento pode ser explicado pela mudança no metabolismo dos lipídios causada pelo envelhecimento da cultura e pelo estresse salino: A síntese dos lipídios de membrana (polares) é desviada para a síntese de triacilgliceróis. Como consequência o teor de lipídios neutros pode ultrapassar a marca de 80% dos lipídios totais (Hu *et al.*, 2008). O aumento do conteúdo dos lipídeos totais na microalga pode estar associado com respostas adaptativas às altas concentrações de salinidade, incluindo mudanças no volume celular e produção de glicerol (AHMED *et al.*, 2017). Alguns processos específicos como restauração da pressão de turgor, regulação da captura e liberação de íons através da membrana celular e acúmulo de solutos osmoprotetores são ativados quando células são expostas a variações de salinidade (TALEBI *et al.*, 2013; ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2000). Estes mecanismos geram um estresse no interior das células da microalga estimulando um aumento no teor de lipídios totais que atuam como material de reserva energética até que surjam condições favoráveis (TALEBI *et al.*, 2013; ASULABH *et al.*, 2012).

Comparativamente, teores de lipídeos neutros encontrados neste trabalho foram semelhantes aos encontrados na literatura para *I. galbana* na salinidade controle (35‰). Kurpan Nogueira *et al.*, 2015, encontraram um teor de lipídios neutros, no 14º dia de crescimento, igual a 18,59% na biomassa seca, enquanto nós obtivemos aproximadamente 17%. Tornabene *et al.* (1983) mostraram que, na microalga *Neochloris oleoabundans*, as condições de estresse levaram a um aumento no acúmulo de lipídios neutros e a uma redução no teor de lipídios polares para valores abaixo de 10% da massa total lipídica. BARTLEY *et al.*, 2013 mostraram que, na microalga marinha *Nannochloropsis salina*, o aumento da salinidade promoveu um aumento no teor de

lipídios totais e no teor de lipídios neutros, entretanto, não houve mudanças significativas no teor de lipídios polares. Estes resultados são comparáveis aos que nós encontramos neste trabalho utilizando *I.galbana*. Finalmente, o mesmo padrão de resposta à salinidade foi encontrado na microalga marinha *Dunaliella salina*. Neste trabalho, quando a salinidade de cultivo foi aumentada progressivamente, um aumento gradual no teor de lipídios totais foi encontrado. Assim, como nos resultados encontrados neste trabalho, o maior acúmulo de lipídios totais em *D. salina* foi observado para a maior salinidade estudada, considerando-se a mesma faixa de salinidade estudada (35 a 60‰) (Ahmed *et al.*, 2017).

Ohse *et al* (2014) encontraram um valor muito semelhante para o teor de lipídeos totais (19,5%) àquele que nós encontramos neste trabalho (20,54%), na fase estacionária do crescimento, em *Isochrysis galbana* cultivada em meio f/2 na salinidade de 35‰. Além deste grupo, Shah *et al.* (2014) estudaram o acúmulo de lipídios totais em *I. galbana* quando cultivada no meio de cultura Conway e encontraram um teor igual a 22,3%. Apesar de valores bem parecidos terem sido encontrados na literatura, é importante ressaltar que o teor de lipídios nas microalgas depende da natureza da espécie, do ambiente em que ela vive, das condições de cultivo e do estado fisiológico da cultura (OHSE *et al.*, 2014). Dessa forma, é bastante comum encontrar valores bastantes distintos no teor de lipídios em uma mesma espécie de microalga. Por exemplo, Becker (1994) mostrou que as espécies da classe Prymnesiophyceae (mesma classe da espécie estudada neste trabalho), apresentam níveis de lipídeos que variavam de 5 a 48% na biomassa seca. Até mesmo a espécie *Isochrysis galbana* pode apresentar uma variação em seu teor lipídico de 7 a 40% na biomassa seca, dependendo do tipo da cepa estudada (MATA *et al.*, 2010).

Acumular lipídeos implica em aumentar a concentração de lipídeos no interior das células das microalgas sem considerar a produção de biomassa total. Já a produtividade de lipídeos leva em conta tanto a concentração de lipídeos no interior das células como também a biomassa total obtida, num dado intervalo de tempo (CHAGAS, 2010). Apesar de terem sido observadas limitações no crescimento de *Isochrysis galbana* com o aumento da salinidade, um aumento na produtividade de lipídeos foi observado. Esse comportamento foi observado por Rodolfí *et al.*, 2009, que relataram que *Nannochloropsis* sp. respondeu ao estresse de deficiência nutricional com um aumento considerável do teor de lipídeos e obtenção de maiores produtividades, mesmo havendo limitação do

crescimento. O efeito do aumento da salinidade em *Isochrysis galabana* foi avaliado e, em termos gerais, pode-se observar um aumento no conteúdo celular em lipídios neutros e totais parecendo que a salinidade não teve uma influência significativa no acúmulo de lipídios polares. Dessa forma, pode-se presumir que o acúmulo de lipídios totais nesta célula é devido ao acúmulo de lipídios neutros. Embora o processo de aclimação não tenha levado a alterações significativas nos teores de lipídeos, comparado às células não aclimatadas, o aumento da salinidade levou a um aumento progressivo no acúmulo de lipídeos, com relação à salinidade controle. Além disso, quando as células foram cultivadas sob as salinidades de 50‰ e 60‰, um maior aumento no teor de lipídios neutros, que dos lipídeos polares pode ser observado.

Pode-se observar um aumento expressivo no teor de lipídios totais (20 para 30%) e no teor de lipídios neutros (17 para 25%) na microalga *I. galbana*. Microalgas com um teor médio de 30% de óleo na biomassa seca, possuem produtividade de biodiesel muito superior (10 vezes, no mínimo) às oleaginosas convencionais (MATA et al., 2010). O acúmulo de lipídios nesta microalga aponta esta espécie como uma possível fonte alternativa para a produção de biodiesel. Segundo GRIFFITHS & HARRISON, (2009) a alta produtividade lipídica é a característica chave de uma espécie para a produção de biodiesel. Além disso, uma das grandes vantagens em se utilizar certas microalgas como matéria prima para produção de biodiesel, se deve à as habilidade de acumular/sintetizar grandes quantidades de óleo/lipídios neutros (de 20 a 50%), crescer numa taxa elevada, aclimatar em alta salinidade (para a qual há pouca concorrência), características essas que fazem da microalga *I. galbana* um potencial para esta utilização biotecnológica (Hu et al., 2008).

A indústria cosmética visa a substituição de ativos artificiais e sintéticos por produtos renováveis, de baixo impacto ambiental e alto rendimento. As microalgas *Chlorella* sp., e *Nannochloropsis atomus*, por exemplo, têm sido utilizadas em preparações cosméticas devido ao seu alto teor de lipídeos, em torno de 30% (SHOW et al., 2017). Estes lipídios possuem alto poder hidratante, com textura agradável e toque seco, ganhando cada vez mais atenção deste setor industrial (NATURA..., 2015). O óleo de *I. galbana* é rico em carotenóides. Desta forma, o óleo desta microalga possui papel importante na indústria cosmética e de alimentos (AHMED et al., 2014). A incorporação do

óleo de microalgas em produtos cosméticos para a pele se torna altamente vantajosa uma vez que estudos mostraram que os carotenoides podem proteger a pele contra os danos causados pela radiação UV. Outros estudos mostraram que o óleo rico em carotenoides pode ser incorporado na dieta, por serem poderosos antioxidantes, protegendo a degeneração celular causada pelos radicais livres (WANG et al. 2014 ; AHMED et al., 2014).

6. Conclusões

A microalga *I. galbana* foi capaz de se aclimatar às diferentes salinidades estudadas neste trabalho. Independentemente da aclimação, ela foi capaz de acumular lipídios, essencialmente lipídios neutros, apresentando a maior porcentagem deste lipídio em torno de 30% na biomassa seca. Embora o estresse causado nesta microalga tenha influenciado negativamente o crescimento e o rendimento final celular, a produtividade foi aumentada. Os métodos atuais utilizados para quantificar/medir lipídios em um grande número de amostras são complexos, cansativos e demandam um grande tempo de análise, normalmente envolvendo extração, purificação, concentração e determinação dos lipídios. Além disso, a quantidade de biomassa utilizada na análise gravimétrica é muito grande, geralmente demandando muito tempo para sua obtenção e um gasto muito grande com solventes orgânicos para determinação lipídica, tornando o processo mais caro e aumentando os riscos à saúde e ao meio ambiente. Desta forma, a comparação dos resultados obtidos entre as análises de fluorescência (qualitativa) e a análise gravimétrica (quantitativa) mostrou uma correlação altamente significativa, indicando que a utilização da técnica de fluorescência é uma alternativa viável, mais econômica, mais rápida e de menor impacto à saúde e ao meio ambiente. Por fim, o estresse salino torna esta microalga uma possível candidata a utilização biotecnológica, sendo um atrativo para diversos setores industriais (biocombustíveis, cosméticos, etc...), visto sua capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios.

7. Referências bibliográficas

- ALKHAMIS Y, QIN JG. Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *BioMed Res Int*, 2013.
- ALONSO DL, BELARBI EL, RODRIGUEZ-RUIZ J, SEGURA CI, GIMENEZ A. Acyl lipids of three microalgae. *Phytochemistry*, v. 47, p. 1473-1481, 1998.
- ALONZO, F., MAYZAUD, P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Mar. Chem.* v. 67, p. 289–301. 1999
- ABED, R.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 1, p. 1-12, 2009.
- AHMED, R.A., HE, M., AFTAB, R.A., ZHENG, S., NAGI, M., BAKRI, R., WANG, C. Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports*, v. 7, p. 8118, 2017.
- AHMED, F., FANNING, K., NETZEL, M., TURNER, W., LI, Y., SCHENK, P.M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters, *Food Chemistry*. 2014.
- ASULABH, K.S., SUPRIYA, G., RAMACHANDRA, T.V. Effect of salinity concentrations on growth rate and lipid concentration in *Microcystis sp.*, *Chlorococcum sp.* and *Chaetoceros sp.* In: LAKE: National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems, p. 27-32, 2012.
- ALLAKHVERDIEV, I.S., SAKAMOTO, A., NISHIYAMA, Y., INABA, M., MURATA, N. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus sp.* *Plant Physiol*, v. 123 (3), p. 1047-1056, 2000.
- AZEREDO, V.B.S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BARTLEY M. L., BOEING W. J., CORCORAN A. A., HOLGUIN F. O., SCHAUB T. Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Biomass Bioenerg*, v. 54, p. 83–88, 2013.
- Becker EW. Microalgae. In: Baddiley SJ, Carey NH, Higgins IJ, Potter WG, editors. *Biotechnology-Microbiology*. New York: Cambridge University Press; 1994. pp. 177–195.

- Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2001.
- BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BOHNERT, H.J., NELSON, D.E., & JONSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*, v. 7, p.1099-1111, 1995.
- CHAGAS, B. M. E. das. Influência do estresse nutricional programado na composição da microalga *Isochrysis galbana*. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.
- CHEN GQ, JIANG Y, CHEN F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. *Food Chem*, v. 109, p. 88-94, 2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25(3), p. 294-306, 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.
- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Callis, P.R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J. Microbiol. Methods* 6, 333–345
- BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae (PDF Download Available)*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/223994644_BODIPY_staining_an_alternative_to_the_Nile_Red_fluorescence_method_for_the_evaluation_of_intracellular_lipids_in_microalgae [accessed Oct 2, 2017].
- COSMETICOSBR. Natura terá óleo sustentável de microalgas da solazyme em seus produtos. Disponível em: <http://www.cosmeticosbr.com.br/conteudo/natura-tera-oleo-sustentavel-de-microalgas-da-solazyme-em-seus-produtos/>. 2015. Acesso em: 15/03/2017, hora: 10:50h.
- DOAN TTY, SIVALOGANATHAN B, OBBARD JP. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass Bioenerg*, v. 35(7), p. 2534e44, 2011
- EPPINK, MICHEL H.M., GIUSEPPE OLIVIERI, HANS REITH, CORJAN VAN DEN BERG, MARIA J. BARBOSA, AND RENE H. WIJFFELS. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, Springer International Publishing AG, 2017.

- FALKOWSKI, PG. & RAVEN, JA. Aquatic photosynthesis. 2nd ed. Princeton University Press, Princeton, p. 488, 2007.
- FORJÁN LOZANO, E. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation, 2007.
- FISHER, M., GOKHMAN, I., PICK, U. & ZAMIR, A. A structurally novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *J. Biol. Chem*, v. 272(3), p. 1565-1570, 1997.
- FISHER, M., GOKHMAN, I., PICK, U. & ZAMIR, A. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem*, v. 271(30), p. 17718-17723, 1996.
- FOLCH J, LEES M, STANLEY GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GRANADO-LORENCIO, F. In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, v. 114, n. 2, p. 747- 752, 2009.
- GRIFFITHS, M.J.; HARRISON, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.*, v. 21, p. 493-507, 2009.
- GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 301, 2006.
- GARCÍA, N., LÓPEZ-ELÍAS, J.A., MIRANDA, A., MARTÍNEZ-POCHAS, M., HUERTA, N. & GARCÍA, A. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, v. 40, p.435-440, 2012.
- GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 301, 2006.
- GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA, p. 26-60, 1975.
- GREENSPAN P, MAYER EP, FOWLER SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, v. 100, p. 965 e 973, 1985.

- GREENWELL H., LAURENS L., SHIELDS R., LOVITT R., AND FLYNN K. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J Royal Soc Interface*, v. 7, p. 703–26, 2009.
- HOEK, C.V.D; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge, Cambridge University Press, p. 667, 1995.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant J*, v. 54, p. 621 – 663, 2008.
- HENLEY, J.W., M.K. MAJOR & L.J. HIRONAKA. 2002. Response to salinity and heat stress in two halotolerant Chlorophyte algae. *J. Phycol*, v. 38, p. 757-766, 2002.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D; ZHANG, X.; CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, v. 87, p.38-46, 2010.
- JOSET, F., JEANJEAN, R. & HAGEMANN, M. Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: deciphering the molecular events. *Physiol. Plant*, v. 96, p. 738-744, 1996.
- KARANDASHOVA, V. & ELANSKAYA, V. Genetic control and mechanisms of salt and hyperosmotic stress resistance in cyanobacteria. *Russ. J. Gen*, v. 41(12), p.1311-1321, 2005
- KALPESH, K.S., HOLGER, S., PEER, M.S. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, v. 5, p. 1532-1553, 2012.
- KIRROLIAA, A., BISHNOIA, R.N., SINGH, N. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *J. Algal Biomass Utiln*, v. 2, p. 28-34, 2011.
- KIRST, G. O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 40, p. 21-53, 1989.
- KAN, G., SHI, C., WANG, X., XIE, Q., WANG, M., WANG, X., MIAO, J. Acclimatory responses to high-salt stress in *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae) from Antarctica. *Acta. Oceanol. Si*, v. 31, p. 116-124, 2012.
- KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal research*, v. 6, p. 52-63, 2014.
- KURPAN NOGUEIRA D.P., SILVA A.F., ARAÚJO O.Q.F., CHALOUB R.M. Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass Bioen*, v. 72, p. 280-287, 2015.

- LEE, R.E. Phycology. Cambridge University Press. Cambridge, p. 484-500, 4 ed., 2008.
- LI, J., LIU, Y., CHENG, J. J., MOS, M., & DAROCH, M. Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high value compounds. *New biotechnology*, v. 32, n. 6, p. 588-596, 2015.
- LIU, Z.-Y., WANG, G.-C., ZHOU, B.-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorell vulgaris*. *Elsevier, Bioresource Technology*, v. 99, p. 4717 – 4722, 2008.
- LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p. 606, 2006.
- LOURENÇO, S. O.; MARQUES JR, N. A. Produção primária marinha. In: *Biologia marinha*. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, Cap. 6, p. 111-154, 2009.
- MAHAJAN, S. & TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys*, v. 444, p.139-158, 2005.
- MATA TM, MARTINS AA, CEATANO NS. Microalgae for biodiesel production and Rather applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev*, v. 14, p. 217-232, 2010.
- METTING, F. B., Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 477-489, 1996.
- MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, Essex, v. 97, 2006.
- MORSCHETT H., WIECHERT W. & OLDIGES M. (2016): Automation of a Nile red staining assay enables high throughput quantification of microalgal lipid production. *Microb Cell Fact*, 2016.
- OHSE, S.; DERNER R. B.; OZÓRIO R. A.; BRAGA M. V. C.; CUNHA P.; CÔRREA, R.G., FURLONG. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia*, v. 33, n. 1, p. 93-101, 2014.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, v. 20, n. 4, p. 459-466, 2003.
- PICARDO MARTA, C. Desempenho de *Isochrysis galbana* na produção de óleo e sequestro de CO₂ com fotobiorreator piloto. p. 2-3, 2012.
- PANCHA, I., CHOKSHI, K., MAURYA, R., TRIVEDI, K., PATIDAR, S. K., GHOSH, A., ET AL. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of

- microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.*, v. 189, p. 341–348, 2015.
- PANCHA, I., CHOKSHI, K., GHOSH, T., PALIWAL, C., MAURYA, R., MISHRA, S. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.*, v. 193, p. 315–323, 2015.
- PASQUET, V. et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 59-67, 2011.
- PARIDA, A.K. & DAS, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox. Environ. Safe*, v. 60, p. 324-349, 2005.
- PEREIRA, R.C., SOARES-GOMES, A. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro, Editora Interciência, p. 382, 2002.
- PICARDO, M. C. Desempenho de *Isochrysis galbana* na produção de óleo e sequestro de CO₂ com fotobiorreator piloto. Tese de Doutorado. Escola de Química- Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro- RJ. 2012.
- PIENKOS, P.T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, v. 3, p.431-440, 2009.
- POOLMAN, B., BLOUNT, P., FOLGERING, J.H.A., FRIESEN, R.H.E., MOE, P.C. & VAN DER HEIDE, T. How do membrane protein sense water stress? *Mol. Microbiol.*, v. 44(4), p. 889-902, 2002.
- PULZ, O., GROSS, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 65, p. 635-48, 2004.
- RAO, A. R. et al. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource technology*, v. 98, n. 3, p. 560-564, 2007.
- REITAN, K.I., RAINUZZO, J.R., OLSEN, Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, v. 30, p. 972-979, 1994.
- RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. In: A. Richmond (ed.). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Boca Raton, p. 69-99, 1986.
- RAO, A.R., DAYANANDA, C., SARADA, R., SHAMALA, T.R., RAVISHANKAR, G.A. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p. 560-564, 2007.

- RODOLFI, L., G. CHINI ZITTELLI, ET AL. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor." *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102(1), p. 100-112, 2009.
- SAOUDI-HELIS, L, DUBACQ, J-P., MARTY, Y., SAMAIN, J-F., GUDIN, C. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone T.iso. *Journal of applied Phycology*, v. 6, p. 315-322, 1994.
- SCHÖRKEN , U.; KEMPERS, P. Lipid biotechnology: industrially relevant production processes. *European Journal of Lipid Science Technology*, v. 111, p.627 – 645, 2009.
- SHAH S., AHMAD A., OTHMAN M., ABDULLAH M. Enhancement of lipid content in *Isochrysis galbana* and *pavlova lutheri* using palm oil mill effluent as an alternative medium, *Chemical Engineering Transactions*, v. 37, p. 733-738, 2014.
- SHAHIDI F. Extraction and measurement of total lipids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.
- SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, ROESSLER P. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program — biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO*, 1998.
- SHIFRIN NS, CHISHOLM SW. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol*, v. 17, p. 374–384, 1981.
- SHOW, P. L., MALCOLM S. Y. TANG, [...], AND JO-SHU CHANG. A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *International journal of molecular sciences*, p. 19-20, 2017.
- SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 2596-2610, 2010.
- SOLOMONS, T.W.G. e FRYHLE, C.B. *Química Orgânica*. Trad. R.M. Matos e D.S. Raslan, 8. ed. Rio de Janeiro, LTC, v. 1, 2005.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- SUDHIR, P. & MURTHY, S.D.S. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, v. 42, p. 481-486, 2004.

- SUKENIK, A. AND WAHNON, R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, v. 97(1), p. 61-72, 1991.
- TALEBI, A.F., TABATABAEI, M., MOHTASHAMI, S.K., TOHIDFAR, M., MORADI, F. Comparative salt stress study on intracellular ion concentration in marine and salt-adapted freshwater strains of microalgae. *Not. Sci. Biol.*, v. 5, p. 309-315, 2013.
- TORNABENE, T.G.; HOLZER, G.; LIEN, S.; BURRIS, N. (1983) "Lipid composition of the nitrogen starved green alga *neochloris oleoabundans*." *Enzyme Microb. Technol.*, v. 5, p.435-440, 1983.
- VIEGAS, V. C. Extração e caracterização do lipídeos da microalga *chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. Universidade Federal do Rio Grande, p. 25-26, 2010.
- WANG, H.D., CHEN, C-C., HUYNH, P., CHANG, J-S. Exploring the potential of using algae in cosmetics, *Bioresource Technology*. 2014.
- WU, H-L.; WANG, G-H.; XIANG, W-Z.; LI, T.; HE, H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties* v. 19, n. 10, p. 2349-2362, 2016.
- WU, X., RUAN, R., DU, Z., LIU, Y. Current status and prospects of biodiesel production from microalgae. *Energies*, v. 5, p. 2667-2681, 2012.
- ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, USA, 3ed, p. 920, 1996.
- ZHU, CJ. & LEE, YK. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol. Journal of Applied Phycology*, v. 9, p. 189-194, 1997.

