



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

DANILO CAVALCANTE DA SILVA

**CULTIVO DA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* COM VARIAÇÃO DE
SALINIDADE E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS E EXOPOLISSACARÍDEOS**

FORTALEZA

2022

DANILO CAVALCANTE DA SILVA

CULTIVO DA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* COM VARIAÇÃO DE SALINIDADE
E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS E EXOPOLISSACARÍDEOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Graduação em Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof.^a Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S579c Silva, Danilo Cavalcante da.
Cultivo da microalga *Chaetoceros Gracilis* com variação de salinidade e seu efeito no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e exopolissacarídeos / Danilo Cavalcante da Silva. – 2022.
48 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante.
1. Diatomácea. 2. Estresse osmótico. 3. Metabólitos secundários. I. Título.

CDD 639.2

DANILO CAVALCANTE DA SILVA

CULTIVO DA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* COM VARIAÇÃO DE SALINIDADE
E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS E EXOPOLISSACARÍDEOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso Graduação em Engenharia de Pesca do
Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de
Pesca.

Aprovada em: __ / __ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues

À minha família!

Fé, trabalho e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas oportunidades e que na sua bondade eterna me fortalece a cada dia. À minha orientadora, Prof.^a Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, pela amizade, confiança e apoio fundamental ao sucesso deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof.^ª. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo e Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues, pela orientação e disponibilização do Laboratório de Biologia Marinha (BIOMAR) que foi essencial no desenvolvimento do trabalho.

À UFC e a Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis PRAE, por todo apoio dado durante a graduação com a residência estudantil, sou extremamente grato.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em especial aos saudosos professores Wladimir Ronald Lobo Farias (*in memoriam*) e Manuel de Andrade Furtado Neto (*in memoriam*), com certeza me marcaram e influenciaram minha caminhada.

À Prof.^ª. Dra Alessandra Cristina da Silva Farias por todo apoio e orientações no tratamento dos dados do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Damiana Cavalcante, e meu pai, José Rivanildo pelo amor, cuidado, orações e apoio incondicional. Ao meu irmão, Bruno Cavalcante pelo companheirismo e amor único.

À minha amada, Nadja Kermmany, meu encontro de paz e amor.

À toda minha família, em especial aos que acompanharam minha jornada e aos meus avós José Lopes, Maria Felix, Valmir Lucas e Maria Ferreira, agricultores do baixo Jaguaribe que com a força do trabalho criaram uma família grande e unida.

Aos meus grandes amigos e colegas de trabalho Daniel Vasconcelos, Giancarlo Lavor e Guilherme Brasil pela parceria e apoio no dia a dia.

Aos amigos e mentores acadêmicos, Dra. Liange Reck e Mrs Hudson Maia.

Aos amigos e companheiros da Residência Universitária 420, Rômulo Lima, Gisleyne Pinheiro, William Santos, Delson e Tio Will, saudosas lembranças.

E aos companheiros de graduação e amigos de UFC, Marques Matos, Gabriel Rodrigues, Tia Graça, Sidcleyton Santos, e Francisco Eugênio.

“Todo homem tem o direito de decidir seu próprio destino” (Bob Marley).

RESUMO

A microalga *Chaetoceros gracilis* é uma espécie de grande importância para nutrição larval de organismos aquáticos, com alta taxa de crescimento e elevado valor nutricional. O estresse induzido em espécies de microalgas devido a luminosidade, nutrientes, temperatura, pH e salinidade, desencadeia a produção de diversos metabólitos, como por exemplo, lipídeos e polissacarídeos. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da salinidade no crescimento da microalga *C. gracilis* e na produção de pigmentos fotossintetizantes e exopolissacarídeos. O experimento, foi dividido em duas etapas com níveis de salinidades distintos, porém, ambas com 20 ppt como controle. O cultivo foi realizado em meio Guillard f/2, em salinidades inferiores (15, 10 e 5 ppt) e superiores (25, 30 e 35 ppt) ao controle, realizado em triplicata, com temperatura de 27° C, iluminação de 5.000 lux, aeração constante e inóculo microalgal de 1:3. Os cultivos tiveram duração de sete dias e para determinação das curvas de crescimento e verificação da densidade celular máxima e velocidade de crescimento foi aferido diariamente, por meio da contagem celular (câmara de Neubauer e microscópio óptico) e medição da absorbância ($\lambda = 680$ nm). Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, feofitina *a* e carotenóides totais) foram determinados pelo método espectrofotométrico. A obtenção de exopolissacarídeos foi obtida por precipitação alcoólica do sobrenadante do cultivo da microalga. A presença de sulfatação foi verificada por ensaio de metacromasia. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). O tratamento com maior valor médio de absorbância foi T25 (1.089 ± 0.05 nm) e o menor foi T5 (0.864 ± 0.35 nm). A maior densidade celular máxima foi obtida em T20 ($497 \pm 1 \times 10^4$ cél mL⁻¹) e T5 apresentou menor valor para este dado ($313 \pm 10 \times 10^4$ cél mL⁻¹). Em relação aos pigmentos fotossintéticos, não foi possível observar diferenças significativas nas concentrações de clorofila *a*, feofitina *a* e carotenóides totais. Ficou evidente que a salinidade influenciou diretamente a produção de exopolissacarídeos. A concentração maior foi em T35 com $3,04 \pm 0,06$ g L⁻¹ de exopolissacarídeos. Desta forma, a microalga *Chaetoceros gracilis* foi capaz de crescer em uma ampla faixa de salinidade, e que, as alterações do parâmetro avaliado, podem influenciar na produção de exopolissacarídeos.

Palavras-chave: diatomácea; estresse osmótico; metabólitos secundários.

ABSTRACT

Chaetoceros gracilis is a microalgae species of great importance for larval nutrition of aquatic organisms, with a high growth rate and high nutritional value. The stress induced in microalgae species due to luminosity, nutrients, temperature, pH and salinity, triggers the production of several metabolites, such as lipids and polysaccharides. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the effect of salinity on the growth of the microalgae *C. gracilis* and on the production of photosynthetic pigments and exopolysaccharides. The experiment was divided into two stages with different salinity levels, however, both with 20 ppt as a control. Cultivation was carried out in Guillard f/2 medium, at lower salinities (15, 10 and 5 ppt) and higher (25, 30 and 35 ppt) than the control, carried out in triplicate, with a temperature of 27° C, lighting of 5,000 lux, constant aeration and 1:3 microalgal inoculum. The cultures lasted seven days and to determine the growth curves and check the maximum cell density and growth velocity, it was measured daily by means of cell counting (Neubauer camera and optical microscope) and measurement of absorbance ($\lambda=680$ nm). Photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, pheophytin *a* and total carotenoids) were determined by the spectrophotometric method. Exopolysaccharides were obtained by alcoholic precipitation of the microalgae culture supernatant. The presence of sulfation was verified by metachromasia assay. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p<0.05$). The treatment with the highest mean absorbance value was T25 ($1,089 \pm 0.05$ nm) and the lowest was T5 ($0,864 \pm 0.35$ nm). The highest maximum cell density was obtained at T20 ($497 \pm 1 \times 10^4$ cells mL⁻¹) and T5 presented the lowest value for this data ($313 \pm 10 \times 10^4$ cells mL⁻¹). Regarding photosynthetic pigments, it was not possible to observe significant differences in the concentrations of chlorophyll *a*, pheophytin *a* and total carotenoids. It was evident that salinity directly influenced the production of exopolysaccharides. The highest concentration was in T35 with 3.04 ± 0.06 g L⁻¹ of exopolysaccharides. In this way, the microalgae *Chaetoceros gracilis* was able to grow in a wide range of salinity, and that, changes in the parameter evaluated, can influence the production of exopolysaccharides.

Keywords: diatom; osmotic stress; secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Microscopia óptica, com contraste de fase e aumento de 400 x, da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i>	13
Figura 2 –	Cultivo prévio da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> para obtenção do volume total de inóculo.....	19
Figura 3 –	Distribuição aleatória dos reatores de cultivo da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> , em meio Guillard f/2 com diferentes salinidades.....	22
Figura 4 –	Vista da câmara de Neubauer em microscópio óptico com contraste de fase (OLYMPUS BX-40).....	23
Figura 5 –	Floculação química (NaOH, 1 M) do cultivo da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> , evidenciando a decantação da biomassa algal.....	24
Figura 6 –	Densidade óptica (680 nm) da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em diferentes salinidades.....	28
Figura 7 –	Aspecto da biomassa úmida da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em diferentes salinidades.....	31
Figura 8 –	Peso total (3 reatores) de biomassa da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em diferentes salinidades.....	32
Figura 9 –	Concentração de exopolissacarídeos (g L ⁻¹) produzido pela diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em diferentes salinidades.....	36
Figura 10 –	Ensaio de metacromasia usando o corante catiônico ADM na presença de 100 µL (1,5 mg de EPs) da solução de exopolissacarídeos produzidos pela diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em diferentes salinidades.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de nutrientes do meio Guillard f/2 modificado.....	20
Tabela 2 – Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2 modificado....	21
Tabela 3 – Preparação de água para o meio de cultivo, Guillard f/2, nas salinidades requeridas.....	21
Tabela 4 – Número de células ($\times 10^4$ cel mL ⁻¹) inicial (1º dia) e final (7º dia) do cultivo da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em diferentes salinidades.....	29
Tabela 5 – Divisão celular máxima (DCM) e velocidade de duplicação por dia (k) do cultivo da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> em diferentes salinidades.....	29
Tabela 6 – Composição de pigmentos fotossintéticos da diatomácea <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada em meio Guillard f/2 com diferentes salinidades.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1	Propagação algal.....	19
2.2	Delineamento e preparação do meio de cultura.....	20
2.3	Inoculação e acompanhamento do cultivo.....	22
2.4	Obtenção de biomassa.....	23
2.5	Quantificação de clorofila <i>a</i>, feofitina <i>a</i> e carotenóides totais.....	24
2.6	Quantificação de exopolissacarídeos (EPS).....	25
2.7	Ensaio de metacromasia dos EPS.....	26
2.8	Análise estatística.....	26
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1	Crescimento algal.....	27
3.2	Rendimento de biomassa.....	31
3.3	Quantificação de clorofila <i>a</i>, feofitina <i>a</i> e carotenóides totais.....	33
3.4	Quantificação de exopolissacarídeos.....	36
3.5	Avaliação do ensaio de metacromasia.....	38
4	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Fitoplâncton é um grupo altamente diversificado de microrganismos, composto por microalgas (organismos eucarióticos) e cianobactérias (procarióticos), que possuem como características comuns a capacidade de realizar fotossíntese, devido a presença de clorofila *a* e outros pigmentos fotossintetizantes, que possibilitam a conversão de energia luminosa em energia química e biocompostos; e nenhuma ou pouca capacidade de vencer os fluxos de correntes de água, estando à mercê das alterações e das dinâmicas físico-químicas dos ambientes onde são encontrados (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2017).

O termo microalgas refere-se a um agrupamento de diversos táxons microscópicos, que podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosos, que apresentam rápido crescimento, sendo encontrados em todo o mundo, principalmente em ambientes aquáticos (costeiros e continentais) e ainda em superfícies terrestres úmidas que podem viver em condições extremas por apresentarem notável adaptabilidade à distintas condições ambientais (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2017).

Formados por um número de espécies ainda não determinado com exatidão, devido a diversidade de ambientes e tamanhos, esse grupo de microrganismos pode ter uma infinidade de espécies. Estima-se que existam entre 200.000 e 800.000 espécies de microalgas, das quais, apenas, cerca de 35.000 foram descritas (MARROQUIN, 2020). É possível que existam entre 10.000 e 100.000 espécies de diatomáceas. (SMOL; STOERMER, 2010; LOURENÇO, 2006).

Os organismos que constituem o fitoplâncton estão distribuídos em sete principais divisões: Cyanophyta (cianobactérias), Glaucophyta (eucariotos verde azuis), Euglenophyta (euglenas), Dinophyta (dinoflagelados), Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Ochrophyta onde estão inseridas as classes Chrysophyceae (algas douradas), Phaeophyceae (algas marrons), e Bacillariophyceae (diatomáceas) (LOURENÇO, 2006; CAVALCANTI, 2016).

Tais grupos se estabeleceram há alguns bilhões de anos na Terra, modificando e se adaptando ao ambiente gerando uma intensa diversidade, com alguns grupos sem qualquer relação filogenética, se diferenciando desde o tipo e forma das paredes celulares, produtos de reserva, pigmentos fotossintéticos e acessórios (OLAIZOLA, 2003). São a base da cadeia trófica aquática (produtores primários), fornecendo energia aos consumidores ao passo que transformam a luz e o carbono em açúcar e oxigênio, possuindo uma extrema importância ecológica como exemplos, no ciclo do carbono, assimilando o gás carbônico principalmente no

ambiente marinho; no ciclo do fósforo, na transformação do azoto em fósforo orgânico nas suas células; no ciclo do nitrogênio, absorvendo os compostos nitrogenados gerados pelos animais e bactérias (RICHMOND, 2004; LOURENÇO, 2006).

Estima-se que a grande parcela do oxigênio gerado mediante a fotossíntese dos organismos que constituem o fitoplâncton, que atuam como grandes consumidores do gás carbônico, principal agente do aquecimento global. Segundo Ricklefs (2003), as macroalgas, as gramas marinhas, microfitobentos e o fitoplâncton marinho, são responsáveis por aproximadamente 52,9 % a 58,8 % da produtividade primária global, fixando anualmente de 45 a 50 gigatoneladas de carbono, e, com o fitoplâncton contribuindo numa maior fração da produtividade primária marinha, representando pelo menos 90 % (LOURENÇO, 2006).

As microalgas da classe Bacillariophyceae, também conhecidas como diatomáceas, se diferenciam das outras algas por sua parede celular formada por até 95 % de sílica, que é dividida em duas partes que se unem formando um tipo de carapaça bastante peculiar, chamadas de frústulas silicosas (HASLE; SYVEETSEN, 1996; LEVITAN *et al.*, 2014). São organismos eucarióticos, microscópicos, unicelulares, dotados de pigmentos fotossintéticos como as clorofilas *a* e *c*, β -caroteno, fucoxantina, diadinoxantina e diatoxantina, crisolaminarina (polissacarídeo formado por unidades de glicose) e gotículas de óleo como produtos de reserva energética. São encontradas principalmente em formas solitárias ou agregadas formando colônias, se classificam mediante a morfologia de suas frústulas como diatomáceas cêntricas, com simetria radial, e diatomáceas penadas, com simetria bilateral. (LOURENÇO, 2006; KALE; KARTHICK, 2015). Constituem um dos grupos mais importantes de microalgas, com altíssima diversidade, representando 40% da biomassa fitoplanctônica global, correspondendo a 25% da produtividade primária líquida global (FIELD *et al.*, 1998; ARMBRUST, 2009; SMOL; STOERMER, 2010).

Dentre as diatomáceas, o gênero *Chaetoceros* é dominante no ambiente marinho, sendo considerada uma diatomácea cêntrica cosmopolita, com muitas espécies tendo alta influencia em diversos ciclos de nutrientes e algumas chegando a ser nocivas por contribuir com marés vermelhas (TANG *et al.*, 2018).

Aproximadamente 400 espécies de *Chaetoceros* já foram descritas (PAL *et al.*, 2013) e este número chega ainda a ser incerto pois é um gênero com muitos nomes interespecíficos e bastante difícil de serem agrupados. As células podem ser solitárias ou em cadeias, em sua maioria inseparáveis formadas pela união de suas cerdas com sílica que emergem do canto das suas células. Podem ter suas cadeias enroladas, curvas ou retas.

Apresentam tamanhos variando entre 2,5 e 12 μm de comprimento. Suas cerdas junto das valvas são as principais características das espécies de *Chaetoceros*, e emergem dos cantos das células nos pontos apicais podendo ser tanto curtas como longas (HASLE; SYVEETSEN, 1996). Entre as espécies mais estudadas e cultivadas podemos citar: *C. gracilis*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *C. ceratosporum*.

Chaetoceros gracilis (Figura 1) é amplamente utilizada para alimentação na aquicultura, larvicultura de crustáceos, peixes e moluscos, graças à sua alta taxa de crescimento e elevado valor nutricional principalmente em sua conhecida produção de lipídeos, em particular, ácidos graxos poli-insaturados (EPA's) como o ácido eicosapentanoico, assim como, proteínas, carboidratos, pigmentos e substâncias antioxidantes (BROWN; BLACKBURN, 2013; TACHIHANA *et al*, 2020; HASSAN *et al*, 2021).

Figura 1 – Microscopia óptica, com contraste de fase e aumento de 400 \times , da diatomácea *Chaetoceros gracilis*



Fonte: Autor

Segundo o Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade (GBIF) a taxonomia da espécie é:

Império: Eucarionte
Reino: Chromista
Filo: Ochrophyta
Classe: Bacillariophyceae
Ordem: Chaetocerotales
Família: Chaetocerotaceae
Gênero: *Chaetoceros* Ehrenberg
Espécie: *Chaetoceros gracilis* Schütt

Os estudos sobre a prospecção e produção de microrganismos que compõem o fitoplâncton têm alavancado vertiginosamente nos últimos anos, impulsionado pela procura por fontes renováveis de energia, visto o aumento da temperatura global e a iminente elevação dos níveis oceânicos, e pela busca de novos princípios ativos e moléculas (PULZ; GROSS, 2004; RICHMOND, 2004; VENKATESAN; MANIVASAGAN; KIM, 2015).

De acordo com a FAO (2020), a produção global total de algas aquáticas foi de 32,4 milhões de toneladas, e de microalgas foi estimado em 87.000 toneladas cultivadas em 11 países em 2018, onde 86.600 toneladas foram cultivadas apenas na China, ou seja 99,5%, embora o próprio censo da FAO relate a subestimação dos dados de alguns países como EUA, França e Israel. A cianobactéria *Arthrospira* sp (Spirulina) é a mais cultivada (22.500 toneladas), com sua biomassa sendo utilizada principalmente na alimentação humana na forma de suplementos nutricionais e para a extração de pigmentos como a ficocianina. Outras microalgas como *Chlorella* sp., *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella* sp. e *Nannochloropsis* sp., tem menor produção, mas, são consolidadas quanto ao cultivo e a produção de biocompostos de alto valor agregado como a astaxantina, β -carotenos e EPA's além da produção de biomassa (DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006; LOURENÇO, 2006).

Um cultivo microalgal é iniciado com a inoculação de uma alíquota concentrada de células em um meio de cultura com nutrientes que viabilizam o crescimento, com as células se reproduzindo, ocupando e consumindo o meio de cultivo (HERNADEZ *et al.*, 2009).

A produção de microalgas apresenta várias características interessantes como: melhor aproveitamento de recursos hídricos, podendo ser cultivadas em ambientes áridos;

ciclos curtos, devido à alta taxa de crescimento podendo ter produção o ano inteiro; boa composição nutricional e maior produtividade por área em comparação com a produção de biomassa agrícolas, como soja e milho (MARINHO *et al.*, 2009; ROY; PAL, 2015; PINA *et al.*, 2021).

Além da utilização das microalgas na aquicultura, como fonte de alimento para diversos organismos aquáticos, elas também podem ser utilizadas como suplemento alimentar de animais de estimação e da pecuária, e para aplicações biotecnológicas, como no uso em cosméticos, corantes alimentícios, biofertilizantes, bioetanol e biodiesel. (SPOLAORE *et al.*, 2006; GUEDES; MALCATA, 2012; MOREIRA, 2021).

A biomassa microalgal proveniente do cultivo é fonte de matéria-prima para atividades distintas, como enfatizou Yang *et al.* (2011), entretanto, a composição bioquímica desta é diretamente influenciada pelos nutrientes inseridos no meio de cultura utilizado e, das condições físico-químicas empregadas no cultivo, sendo então possível controlar e influenciar a produção de diversas substâncias de interesse (DERNER, 2006). Os principais fatores que afetam o crescimento das microalgas são: temperatura, intensidade luminosa, pH, quantidade de nutrientes e salinidade (RICHMOND, 2004). De acordo com Iglesias *et al.*, 2019, as microalgas são consideradas uma das fontes mais promissoras de novos produtos e aplicações principalmente com o desenvolvimento de uma bioeconomia ou economia verde (FAO, 2020).

Dentre as várias biomoléculas produzidas, as microalgas têm capacidade de sintetizar diversos compostos, dentre elas proteínas; carboidratos (monômeros e polissacarídeos); lipídeos, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados ácido araquidônico (ARA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA); e pigmentos como as clorofilas, carotenóides (astaxantina, β -caroteno, luteína, cantaxantina etc.) e ficobilinas (ficobiliproteínas). Cada classe de microalgas possui características diferentes, apresentando sua própria combinação de pigmentos o que implica em colorações distintas (azul esverdeado, verde, amarelo, dourado e vermelha) (ALONSO *et al.*, 1995; BECKER, 2004; DENNER, 2006).

As clorofilas são os pigmentos que possibilitam os organismos captarem a luz solar e produzir glicose (energia) e oxigênio através da fotossíntese (ORONA-NAVAR *et al.*, 2021). A clorofila *a* é o pigmento fotossintético basal, presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica (STREIT *et al.*, 2005). As clorofilas *b*, *c* e *d* podem também ser encontradas, sendo moléculas que passaram por mudanças, tomando como base a estrutura da clorofila *a*, atuando como co-autores na atividade fotossintética principalmente absorvendo

comprimentos de luz não absorvidos pela clorofila *a* (ZEPKA; JACOB-LOPES; ROCAM, 2019).

Esses pigmentos estão localizados nos cloroplastos, onde realizam duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Tais organelas, além das clorofilas, contêm outros pigmentos chamados acessórios, como os carotenóides (carotenos e xantofilas) (STREIT *et al.*, 2005; BERG; SUTULA, 2015).

Os carotenoides funcionam como pigmentos fotossintéticos secundários fotoprotetores (BOROWITZA; BOROWITZA, 1988). Diversas espécies podem acumular uma grande concentração de β -caroteno, astaxantina ou cantaxantina, por exemplo, a espécie *Dunaliella salina* é uma importante fonte de β -caroteno, com seus cultivos comerciais sendo realizados buscando acumular elevadas concentrações deste pigmento, que pode corresponder a 14% de seu peso seco (MOREIRA, 2021), como consequência da elevada incidência luminosa e a alta salinidade que geram estresse (desequilíbrio osmótico) nas células, que respondem com aumento na produção de β -caroteno (DENER, 2006). *Haematococcus pluvialis* é conhecida como a espécie com maior capacidade de acumular astaxantina (carotenóide com altíssimo poder antioxidante), podendo conter entre 1,5 e 3% deste pigmento em sua biomassa seca. A produção de astaxantina é induzida principalmente sob condições de estresse, como deficiência de nitrogênio e elevada intensidade luminosa (CORDERO-ESQUIVEL *et al.*, 1996; DENER, 2006; MOREIRA, 2010).

As microalgas do gênero *Chaetoceros* possuem principalmente clorofilas *a* e *c*, e carotenóides como a fucoxantina, um epoxicarotenol característico de algas marrons (HASTINGS *et al.*, 2016). A fucoxantina também é encontrada nas macroalgas pardas, Phaeophyceae, e nas diatomáceas onde é possível observar concentrações aproximadamente quatro vezes maior do que em macroalgas (AQUINO, 2021) o que torna esses microrganismos uma fonte promissora de fucoxantina.

Na indústria, os pigmentos naturais são usados principalmente como corantes, aditivos alimentares, em fórmulas de cosméticos como antioxidantes e em ensaios imunológicos (PULZ; GROSS, 2004; DENER, 2006). Deste modo, tem-se estimulado a pesquisa para a produção e o uso de clorofilas e carotenóides naturais (MARROQUIN, 2020).

As microalgas ainda podem excretar diversas substâncias extracelulares durante o seu ciclo de vida (DISCART *et al.*, 2014) algumas espécies se utilizam desse mecanismo formando uma matriz de biofilme hidratada como exemplo a cianobactéria *Nostoc* sp. e as diatomáceas *Coscinodiscus* sp., *Nitzschia* sp. e *Amphora* sp. (NETO; PINOTTI, 2004;

ASCENCIO, 2004). Tais substâncias consistem principalmente de exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (XIAO; ZHENG, 2016). Podem ser encontrados ligados à superfície das células ou excretados para o meio extracelular. (YU *et al.*, 2012).

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos, constituídos por monossacarídeos conectados através de ligações glicosídicas sendo geralmente reconhecidos como metabólitos não tóxicos (DOGRA *et al.*, 2017), compostos por cadeias de 40 a 50 monossacarídeos diferentes (hexoses e pentoses), incluindo muitos açúcares complexos e estando presentes em muitos organismos (DELATTRE *et al.*, 2016). Estas moléculas de açúcares podem ser encontradas principalmente em bactérias, fungos e microalgas (OTOBONI, 2007), e suas composições podem variar devido a espécie, tipos de monossacarídeos e ligações glicosídicas (PHILIPPINI, 2017).

Alguns fatores ambientais podem afetar a síntese de EPS, incluindo variações nos níveis de oxigênio, concentrações altas dos cátions magnésio e cálcio, dessecação, baixas temperaturas, crescimento em meio pobre ou limitação de nutrientes, principalmente nitrogênio (WEINER; LANGILLE; QUINTERO, 1995; OTOBONI, 2007).

Estes compostos podem apresentar propriedades químicas vantajosas para novas aplicações, sendo uma alternativa aos materiais tradicionalmente utilizados em diversas indústrias, atuando como estabilizadores, espessantes ou emulsificantes (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998; MORENO *et al.*, 1998; OTERO; VINCENZINI, 2003).

Estudos recentes com exopolissacarídeos microbianos demonstram que essas substâncias podem atuar no tratamento e na prevenção de doenças e, por isso, serem utilizadas na formulação de diversas drogas, dada as atividades antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (MARAN; MEKALA; MANIKADAN; 2013; RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013; PARK *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Já em organismos aquáticos, a aplicação de EPS pode ajudar a reduzir os efeitos do estresse animal no ambiente de cultivo, principalmente em pós-larvas de peixes e camarões auxiliando em menores índices de mortalidade (MOREIRA, 2010).

As condições do cultivo de microalgas podem induzir a produção de metabólitos relevantes. A interação de fatores biológicos exógenos e endógenos, com fatores químicos e físicos, podem gerar influência nas taxas metabólicas da espécie cultivada afetando o desenvolvimento algal e a produção de diversos compostos (DENER, 2006). Os principais fatores físico-químicos que influenciam as culturas de microalgas são: intensidade luminosa, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (DENER, 2006; MINGGAT; ROSELI;

TANAKA, 2021). Durante o cultivo, alterações na temperatura e nos nutrientes ofertados podem aumentar a síntese de lipídeos pelas microalgas (RASTOGI *et al.*, 2018).

Na natureza, a variação de salinidade no mar, causada pelas marés e aporte de água doce dos rios e das chuvas, pode causar diversos efeitos nos organismos marinhos. No caso das microalgas a busca por se adaptar aos níveis diferentes de sais pode desencadear mudanças no metabolismo, alterações na morfologia celular e na maior ou menor produção de diversos compostos (BEHRENS; KYLE, 1996; OSHE *et al.*, 2007), por exemplo, em *D. salina* há um aumento de produção de carotenóides, quando associado a alta intensidade luminosa (TAFRESHI; SHARIATI, 2009), e em *Isochrysis galbana* um aumento no teor de lipídeos (PEREIRA, 2017), e este fato está envolvido na proteção contra o estresse salino (HUFLEJT *et al.* 1990; KHAMUTOV *et al.* 1990).

Segundo Sudhir e Murthy (2004) o aumento na concentração de sais afeta principalmente as taxas de fotossíntese e respiração; distribuição de minerais; toxicidade iônica e permeabilidade da membrana celular (ASULABHA; SUPRIYA; RAMACHANDRS, 2012). Diante destas alterações, as algas produzem alguns metabólitos para: se adaptarem à lesão causada pelo sal; ajustar o gasto energético do metabolismo, para manter o equilíbrio osmótico; e protegem a estrutura celular (BARROS, 2010; RICHMOND, 1986).

O gênero *Chaetoceros* apesar de ser marinho, e por isso espera-se que os níveis ótimos de concentração salina do meio sejam próximos ao da água do mar (35 ppt), apresenta espécies halotolerantes (ISHIKA *et al.*, 2017 e 2019), como por exemplo, *C. gracilis* que pode crescer em diferentes níveis de salinidade.

Então, em um cultivo de microalgas é essencial determinar as potenciais espécies (com elevada produtividade e melhoramento genético) e as condições ambientais ideais (pH, luz, salinidade, temperatura e nutrientes), assim como, conhecer de que forma a interação entre os componentes bióticos e abióticos influencia na produção de biomassa algal e biocompostos (DERNER, 2006; DAPHNE *et al.*, 2015; SANTOS, 2019), para que desta forma, seja possível otimizar cultivos intensamente densos com altas concentrações de biomoléculas de interesse (CARVALHO; MIYAWAKI, 2020; MARROQUIN, 2020).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento da diatomácea *C. gracilis* e a produção de pigmentos fotossintético (clorofila *a*, feofitina *a* e carotenoides totais) e EPs, sob o efeito da variação da concentração de sal (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 ppt) no meio de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Propagação algal

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Planctologia, do Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA), do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Primeiramente, a cepa da microalga *C. gracilis* (Bacillariophyceae), proveniente do banco de cepas em tubo de ensaio, foi submetida à propagação gradativa partindo de 5 mL, utilizando meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975) modificado, na salinidade usual do laboratório (20 ppt), duplicando o volume a cada dois dias até o atingir 2.000 mL, em Erlenmeyer, com iluminação e aeração constantes, pH 8,2 e temperatura média de 27 °C.

Para obter volume suficiente de inóculo, para iniciar o experimento, foi realizado um cultivo prévio, em triplicata, com os 2 L de cepa de *C. gracilis* em garrações de polipropileno com 15 L de cultura algal (Figura 2), possibilitando o acompanhamento da densidade de células e fixação da quantidade a ser inoculada que foi de 200 cel mL⁻¹.

Figura 2 – Cultivo prévio da diatomácea *Chaetoceros gracilis* para obtenção do volume total de inóculo



Fonte: Autor.

2.2 Delineamento e preparação do meio de cultura

O efeito da variação de salinidade na microalga *C. gracilis*, no crescimento e produção de metabólitos secundários foi avaliado utilizando um delineamento inteiramente casualizado com um tratamento controle e seis tratamentos experimentais, em triplicatas.

O experimento foi dividido em duas etapas, a primeira com meio Guillard f/2 com salinidades superiores a 20 ppt, e a segunda com salinidades inferiores a 20 ppt. Em ambas as etapas, os parâmetros utilizados (luz, pH, temperatura e quantidade de células de inóculo) foram mantidos constantes. Os tratamentos consistiram na utilização de diferentes salinidades: T5 (5 ppt), T10 (10 ppt), T15 (15 ppt), T20 (20 ppt, controle em ambas as etapas), T25 (25 ppt), T30 (30 ppt) e T35 (35 ppt), totalizando 24 unidades experimentais.

Os recipientes utilizados foram garrafas do tipo PET (poli tereftalato de etila) com capacidade de 5,0 L e volume útil de 4,0 L, na proporção de 1 L de inóculo e 3 L de meio de cultivo.

As culturas foram mantidas com temperatura de 27° C, aeração direta fornecida por um soprador com fluxo de ar de 3 L min⁻¹, acoplado a um filtro artesanal constituído de manta acrílica, algodão e carvão ativado, além de, fotoperíodo de 24 horas luz, com iluminância de 5.000 Lux, fornecida por 4 lâmpadas tubulares de LED de 18 W.

O meio de cultura utilizado foi o Guillard f/2 modificado, um semidefinido amplamente utilizado em cultivos de microalgas tanto marinhas quanto dulcícolas (LOURENÇO, 2006), cujas as composições de nutrientes e de metais traço estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Composição de nutrientes do meio Guillard f/2 modificado

Soluções	Reagentes	Solução estoque (g L ⁻¹)	Volume (mL) utilizado para 1L de meio
I	Nitrato de sódio	75,0	1,0
II	Fosfato de sódio	5,0	1,0
III	Silicato de sódio	30,0	1,0
IV	Metais traço	-	1,0
V	Vitaminas	*	0,5

Fonte: Elaborado pelo Autor, adaptado de LOURENÇO, 2006.

*Para solução de vitaminas foi utilizado um par de ampolas do composto vitamínico Citoneurin 5000 (B1 e B6, 100 mg e B12 5000 µg) em 50 mL de água destilada previamente autoclavada.

Tabela 2 – Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2 modificado

Componentes	Solução estoque (g L ⁻¹)	Quantidade na solução de metais traço
Sulfato de cobre	9,8	1 mL L ⁻¹
Sulfato de zinco	22,0	1 mL L ⁻¹
Cloreto de manganês	180,0	1 mL L ⁻¹
Cloreto de cobalto	10,0	1 mL L ⁻¹
Molibdato de sódio	6,3	1 mL L ⁻¹
Na ₂ EDTA	4,36	1 mL L ⁻¹
Cloreto férrico	31,5	1 mL L ⁻¹

Fonte: Elaborado pelo Autor, adaptado de LOURENÇO, 2006.

Cada solução de metais traço, preparada em água destilada, foi autoclavada separadamente em frasco âmbar, e em seguida foi utilizado 1 mL de cada, para preparar uma 1 L de solução estoque final de metais-traço.

As preparações do meio de cultivo nas salinidades desejadas foram feitas utilizando água do mar filtrada com salinidade 30 ppt e água destilada ou sal marinho. As salinidades foram calculadas, conforme a Equação 1, considerando a diluição causada pela inoculação da cepa mãe, que tinha salinidade 20 ppt (na proporção de 1:3 / inóculo:meio) e a variação resultante desta mistura de solutos na salinidade final desejada para o cultivo.

$$C1.V1 + C2.V2 = CF.VF \quad (\text{Equação 01})$$

Onde: C₁= Salinidade do inóculo de microalga; C₂= Salinidade requerida para a diluição; C_F= Salinidade final do tratamento; V₁= Volume de inóculo de alga; V₂= Volume do meio de cultura e V_F= Volume final dos tratamentos.

Como em cada repetição eram necessários 3 L de meio, para cada tratamento foram preparados 9 L de água em salinidades que permitissem, após a inoculação da cepa (salinidade 20 ppt), alcançar as salinidades desejadas (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 ppt), conforme demonstrado na Tabela 3. Os teores de sal, em todas as etapas do experimento, foram mensurados com refratômetro manual de marca ATAGO.

Tabela 3 – Preparação de água para o meio de cultivo, Guillard f/2, nas salinidades requeridas

Procedimento	Sal 5	Sal 10	Sal 15	Sal 20	Sal 25	Sal 30	Sal 35
Salinidade requerida para 9 L de água (ppt)	0	7	13	20	27	33	40
Diluição com água destilada (L)	9	7	5	3	1	NA	NA
Acréscimo de sal (g)	NA	NA	NA	NA	Na	30	90

Fonte: Elaborado pelo Autor.

NA- Não se aplica

Para evitar a precipitação de compostos devido a força iônica, a água nas salinidades requeridas e as soluções estoque de nutrientes e metais traços, utilizadas nas preparações dos meios de cultura, foram esterilizadas separadamente, em autoclave, a 121 °C, por 15 min e pressão de 1 ATM (LOURENÇO, 2006).

Os garrafões utilizados como reatores e as mangueiras de aeração, que são materiais que não suportam o processo de autoclavagem, foram higienizados com água clorada (2,0 %) e posteriormente enxaguados com água destilada estéril.

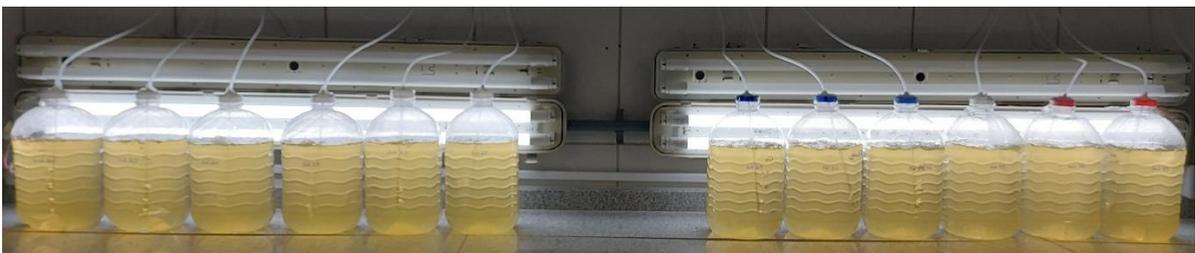
2.3 Inoculação e acompanhamento do cultivo

As culturas foram inoculadas de forma direta com volume fixo de um litro de cepa mãe em densidade celular de 200 cel mL⁻¹, estabelecida anteriormente. O método de cultivo adotado foi o batelada ou estanque (LOURENÇO, 2006) no qual nenhum componente é adicionado até a finalização do experimento, o que permite melhor observação do desenvolvimento da espécie e de suas características.

Após a inoculação, os reatores foram distribuídos aleatoriamente na bancada (Figura 3) e o crescimento da cultura foi acompanhado diariamente, por contagem celular, em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico com contraste de fase (OLYMPUS BX-40), como apresentado na Figura 4. A densidade óptica foi medida utilizando espectrofotômetro (HACH DR 2000) em $\lambda = 680$ nm.

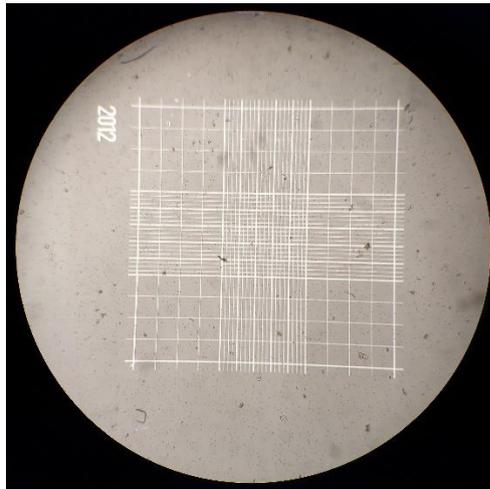
Com os dados de absorbância e contagem celular foi possível elaborar as curvas de crescimento para cada tratamento, afim de avaliar a presença ou não de diferença estatística por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3 – Distribuição aleatória dos reatores no cultivo da diatomácea *Chaetoceros gracilis*, em meio Guillard f/2 com diferentes salinidades



Fonte: Autor.

Figura 4 – Vista da câmara de Neubauer em microscópio óptico com contraste de fase (OLYMPUS BX-40)



Fonte: Autor.

Através da contagem celular foi possível obter os parâmetros ou densidade celular máxima (DCM), que considera o dia de cultivo no qual a população microalgal alcançou a máxima densidade celular; e a velocidade de crescimento (k), que é representada pelo número de divisões celulares dia^{-1} , determinada através da equação citada por Lourenço (2006), entre os dias inicial e final de cultivo, como apresentado abaixo:

$$k = \frac{\log_2\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{\Delta t} \quad (\text{Equação 02})$$

Onde, k representa as duplicações dia^{-1} , N_t corresponde ao número de células no final do intervalo de tempo, N_0 corresponde ao número de células no início do intervalo de tempo e Δt representa a variação do tempo.

O cultivo durou sete dias, e após esse período, uma alíquota de 10 mL foi coletada para a determinação de pigmentos fotossintéticos e outra de 100 mL para quantificação de exopolissacarídeos.

2.4 Obtenção de biomassa

Após a retirada das alíquotas para determinação de pigmentos fotossintetizantes e exopolissacarídeos, foi adicionado, no restante da cultura, NaOH 1 M na proporção de 60:1000 mL (NaOH/meio de cultura) para a obtenção da biomassa através de floculação química.

Depois da separação em duas fases (Figura 5), com a biomassa decantada, foi realizado o sifonamento do sobrenadante e posteriormente a lavagem da biomassa em água corrente. A biomassa úmida foi desidratada em estufa com circulação de ar a 50° C por 48 h.

Figura 5 – Floculação química (NaOH, 1 M) do cultivo da diatomácea *Chaetoceros gracilis*, evidenciando a decantação da biomassa algal



Fonte: Autor.

2.5 Quantificação de clorofila *a*, feofitina *a* e carotenóides totais

Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, feofitina *a* e carotenóides totais) foram quantificados de acordo com Lourenço (2006) e CETESB (2014). Para tanto, alíquotas de 10 mL das culturas foram filtradas à vácuo em malha de 0,45 μ m.

Os filtros com a biomassa foram colocados em tubos Falcon e adicionados 25 mL de acetona (90%). Os tubos foram recobertos com papel alumínio, para evitar o contato com a luz e a fotooxidação, e armazenados sob refrigeração (4 °C) por 24 h. Decorrido este tempo, os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min.

Após a centrifugação, nos extratos, foram realizadas as leituras das absorvâncias em cubeta de caminho óptico de 2,5 cm, nos comprimentos de onda de 664 e 750 nm para a quantificação de clorofila *a* e feofitina *a*, já para carotenóides totais, as leituras foram realizadas em 480, 510 e 750 nm. Com a finalidade de quantificar os resíduos clorofila que não reagiram inicialmente, depois das primeiras leituras de absorvâncias, os extratos foram acidificados com 30 μ L de ácido clorídrico a 0,1 M e realizada novas leituras, nos mesmo comprimentos de ondas.

Para os cálculos das concentrações foram utilizadas as fórmulas propostas por LOURENÇO (2006), sendo:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 26,73 \times [(A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - (A_{a664\text{nm}} - A_{a750\text{nm}})] \times v \times c \quad (\text{Equação 03})$$

$$\text{Feofitina } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 26,73 \times [1,8 \times (A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - (A_{a664\text{nm}} - A_{a750\text{nm}})] \times v \times c \quad (\text{Equação 04})$$

Onde, 26,73 é o coeficiente de absorção, “v” é o volume de acetona (mL); “V” é o volume filtrado da cultura (L); “c” é o caminho óptico da cubeta (cm); “A” é a absorbância e “a” é a indicação da absorbância após a adição do ácido.

$$\text{Carotenóides totais (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{7,6 \times A_{480\text{nm}} - (3,0 \times A_{750\text{nm}}) - (1,49 \times A_{510\text{nm}}) - (2,0 \times A_{750\text{nm}})}{(V \times c)} \times v \quad (\text{Equação 05})$$

Onde, os valores 7,6; 3,0; 1,49 e 2,0 são coeficientes de absorção. “v” é o volume de acetona (mL); “V” é o volume filtrado da cultura (L); “c” é o caminho óptico da cubeta (cm) e “A” é a absorbância.

2.6 Quantificação de EPs

Para a obtenção dos EPs foi utilizada a metodologia adaptada de Guzmán-Murillo e Ascencio (2000) utilizando álcool comercial 92,8% na proporção de 2:1 em alíquotas de 200 mL, para promover a precipitação a -16 °C por 72 h. Após a precipitação dos EPs, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 7280 × g, e os *pellets* obtidos lavados duas vezes com álcool comercial 80% e posteriormente centrifugados.

O material obtido em cada salinidade foi seco em estufa com circulação de ar a 60° C por 12 h e, e o rendimento dos EPs posteriormente expresso em g L⁻¹ (n = 3).

2.7 Ensaio de metacromasia dos EPs

Para verificar a presença de sulfatação nos EPs, obtidos em cada salinidade de cultivo de *C. gracilis*, foi realizado o ensaio de metacromasia, que se baseia na diferença cromatográfica das amostras na presença do corante catiônico azul 1,9-dimetilmetileno (ADM) que se liga especificamente à glicosaminoglicanos sulfatados (ARANZADI *et al.*, 2006). A reação com o corante ADM permite a formação de um complexo na presença de polissacarídeos aniônicos através da alteração na cor rosa-violeta (FARNDAL; BUTTLE; BARRET, 1986; MULLER; HAMSCHKE, 1996).

No teste, amostras dos EPs foram preparadas em água destilada na concentração de 15 mg mL⁻¹, das quais 3 µL de cada foram inicialmente avaliadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de ADM, e assim progressivamente, utilizando alíquotas de iguais volumes até a visualização de mudança de cor.

2.7 Análise estatística

Os resultados de crescimento foram analisados mediante a comparação de curvas de crescimento, densidade celular máxima (DCM) e velocidade de crescimento (k) através da análise de variância (ANOVA) simples ($p < 0,05$). Já os resultados da quantificação de pigmentos fotossintéticos e de exopolissacarídeos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples ($p < 0,05$). No caso de diferenças significativas entre os dados, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento algal

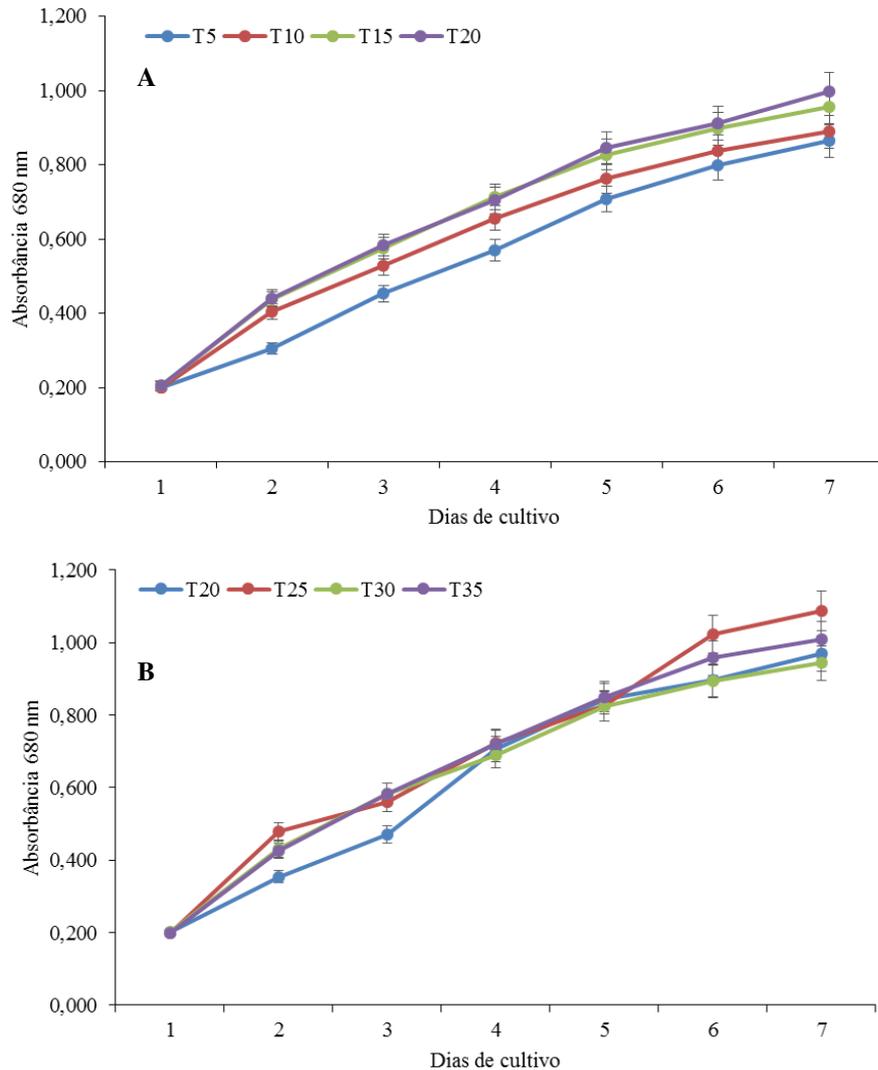
Foi possível observar no cultivo realizado na primeira etapa, com salinidades inferiores a 20 ppt, que o T5 apresentou a menor absorvância entre os tratamentos a partir do segundo dia de cultivo ($0,305 \pm 0,001$), e este perfil seguiu até o final de sete dias, entretanto, com valor semelhante ao apresentado por T10. Nesta etapa, foi possível observar que a salinidade influenciou de maneira positiva o valor da absorvância, com o máximo igual a $0,998 \pm 0,018$, entretanto este não diferiu do valor de T15 ($0,957 \pm 0,011$), após sete dias de cultivo (Figura 6A).

Na segunda etapa de cultivo, realizado com salinidades superiores a 20 ppt, o tratamento T25 apresentou os maiores valores de absorvância ao logo de sete dias, com exceção dos valores observados entre os dias 3 e 5, que foram estatisticamente semelhantes aos demais ($p \leq 0,05$). No final do experimento, a absorvância de T25 foi igual a $1,089 \pm 0,05$ (Figura 6B).

Desta forma, foi possível observar que ocorreu crescimento microalgal em todas as salinidades e que o melhor desempenho de *C. gracilis* ocorreu na salinidade 25 ppt.

Lopes (2020) cultivou *C. gracilis*, visando a produção de biocombustíveis, em condições semelhantes (Guillard f/2, 5.000 lux, temperatura de 30° C e salinidades 5, 10, 15, 20, 25 e 35). Ele observou crescimento em todas as salinidades, mas o melhor desempenho ocorreu na salinidade 10 com absorvância ($\lambda=700\text{nm}$) de $0,299 \pm 0,008$ nm, que também apresentou o maior rendimento de biomassa ($1,27 \text{ g L}^{-1}$). Diferentemente do obtido neste trabalho, no qual nesta salinidade observou-se o menor desempenho, e, com os melhores crescimentos observados em salinidades acima de 15 ppt. O uso de comprimentos de onda diferentes de leitura pode indicar a diferença dos valores de absorvância, mas o perfil de crescimento foi diferente do obtido pelos autores.

Figura 6 – Densidade óptica (680 nm) da diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em diferentes salinidades



Fonte: Autor

A- cultivo da etapa 1 – realizado com salinidades inferiores a 20 ppt; B - cultivo da etapa 2 – realizado com salinidades superiores

Em relação a contagem celular, na primeira etapa de cultivo, com salinidades inferiores a 20 ppt, no final do experimento (7º dia) a menor contagem celular foi observada em T5 ($313 \pm 10 \times 10^4$ cél mL⁻¹) e a maior em T20 ($497 \pm 1 \times 10^4$ cél mL⁻¹). T10 e T15 não apresentaram diferença significativa. No cultivo realizado nas salinidades superiores a 20 ppt, foram semelhantes aos da etapa um, entretanto eles não apresentaram diferenças estatística ($p < 0,05$) com valores nominais variando entre $383 \pm 12 \times 10^4$ cél mL⁻¹ (T30) e $446 \pm 31 \times 10^4$ cél mL⁻¹ (T20), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Número de células ($\times 10^4$ cel mL⁻¹) inicial (1º dia) e final (7º dia) do cultivo da diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em diferentes salinidades

	Tratamento	Nº de células inicial ($\times 10^4$ cel mL ⁻¹)	Nº de células final ($\times 10^4$ cel mL ⁻¹)
1ª Etapa	T5	53 ± 1	313 ± 10 a
	T10	47 ± 2	395 ± 12 b
	T15	44 ± 2	422 ± 20 b
	T20	47 ± 2	497 ± 30 c
2ª Etapa	T20	57 ± 3	446 ± 31 a
	T25	52 ± 4	400 ± 10 a,b
	T30	57 ± 1	383 ± 12 b
	T35	57 ± 3	399 ± 21 a,b

Fonte: Elaborado pelo Autor

No cultivo realizado com as salinidades inferiores a 20 ppt, foi possível observar menor DCM no tratamento T5 ($313 \pm 10 \times 10^4$ cel mL⁻¹) e o maior em T20 ($497 \pm 1 \times 10^4$ cel mL⁻¹). Já no experimento com salinidades superiores, T20 também foi o tratamento com maior quantidade de células nominalmente ($446 \pm 31 \times 10^4$ cel mL⁻¹), mas não diferindo estatisticamente de T25 e T35. T30 foi o tratamento com menor DCM ($383 \pm 12 \times 10^4$ cel mL⁻¹), mas foi semelhante com T25 e T35, conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Divisão celular máxima (DCM) e velocidade de duplicação por dia (k) do cultivo da diatomácea *Chaetoceros gracilis* em diferentes salinidades

	Tratamento	DCM ($\times 10^4$ cel mL ⁻¹)	k (Divisão celular dia ⁻¹)
1ª Etapa	T5	313 ± 10 a	0,427 ± 0,003 a
	T10	395 ± 12 b	0,512 ± 0,017 b
	T15	422 ± 20 b	0,544 ± 0,020 b, c
	T20	497 ± 1 c	0,568 ± 0,005 c
2ª Etapa	T20	446 ± 31 a	0,503 ± 0,03 a
	T25	400 ± 10 a,b	0,492 ± 0,014 a, b
	T30	383 ± 12 b	0,459 ± 0,009 b
	T35	399 ± 21 a,b	0,469 ± 0,015 a, b

Fonte: Elaborado pelo Autor

Em relação a velocidade de duplicação celular por dia, no cultivo realizado com salinidades entre 5 e 20 ppt, o T5 foi o que apresentou a menor velocidade de divisão celular ($k = 0,427 \pm 0,003$ cel dia⁻¹), os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$). O cultivo realizado nas maiores salinidades oscilou entre $0,459 \pm 0,009$ e $0,503 \pm 0,030$ divisão dia⁻¹. Em ambas as etapas, os valores de k ficou em torno de 0,5 divisão dia⁻¹ (Tabela 5), representados em escala logarítmica, indicando que nos tratamentos houve duplicação da cultura a cada dois dias.

Holanda (2017) cultivou *Chaetoceros muelleri* em efluente de camarão e meio Guillard f/2, com salinidade 30 ppt, inoculando uma média de $50 \pm 8 \times 10^4$ cel mL⁻¹ e obteve densidades celular máxima iguais a $154,2 \times 10^4$ e $153,8 \times 10^4$ cel mL⁻¹, respectivamente. Entretanto, esses valores foram alcançados em dias diferentes, no efluente a DCM ocorreu no nono dia de cultivo e em Guillard f/2, no sétimo dia. Quando comparado com o presente trabalho, os valores de DCM foram inferiores, porém, as taxas de crescimento (k) foram semelhantes ($0,57 \pm 0,25$ e $0,56 \pm 0,26$ divisão dia⁻¹, respectivamente em efluente e Guillard f/2), aos observados em T15 e T20, porém superiores a T30.

Espinal; Portillo; Martinez (2015) cultivou *Chaetoceros muelleri* nas salinidades 7; 20 e 34 ppt e obteve o melhor desempenho na salinidade 20 ppt com densidade celular igual a 385×10^4 cel mL⁻¹ e menor desempenho na salinidade 7 com densidade celular de 243×10^4 cel mL⁻¹ resultado que ele atribuiu às condições hipo-osmóticas enfrentadas pela espécie.

Barros (2010) produziu *Chaetoceros muelleri* nas salinidades 15; 25 e 35 em meio Guillard f/2, a 28 °C e 200 µE cm⁻² de irradiância. Ao avaliar o crescimento da cultura por absorbância (DO 700nm) e contagem celular (cel mL⁻¹) observou maior densidade celular (DCM) nas salinidades 15 ppt ($163 \pm 15 \times 10^4$ cel mL⁻¹) e 25 ppt ($176 \pm 29 \times 10^4$ cel mL⁻¹). Estes valores foram superiores ao encontrado na salinidade 35 ppt, que foi de $103 \pm 3 \times 10^4$ cel mL⁻¹. Para a taxa de crescimento (k) o autor observou as maiores taxas de divisões celulares por dia na salinidade 15 ppt ($0,90 \pm 0,12$ divisão dia⁻¹), seguido da salinidade 35 ($0,63 \pm 0,18$) e 25 ($0,55 \pm 0,11$ divisão dia⁻¹) dado que o tempo foi diferente entre as salinidades, com 15 ppt alcançado DCM em 73h, 25 ppt em 96 h e 35 ppt em 48 h.

Asulabha; Supriya; Ramachandra (2012) verificaram, por contagem celular, de *Chaetoceros* sp. submetida a um alto estresse salino, 35 ppt (controle); 175 ppt e 350 ppt de sal, observando no terceiro dia de cultivo em 35 ppt DCM igual a $24,9 \times 10^4$ cel mL⁻¹. No tratamento 75 ppt a DCM foi de aproximadamente 23×10^4 cel mL⁻¹, apenas no quinto dia, e em 350 ppt, alcançou DCM em torno de 18×10^4 cel mL⁻¹, no terceiro dia.

Bhattacharjya *et al.* (2020) realizaram o cultivo de diferentes diatomáceas marinhas (*Thalassiosira* sp., *Skeletonema* sp. e *Chaetoceros* sp.) por 21 dias, observando máxima densidade celular (DCM) e produção de biomassa em *Chaetoceros* sp. ($119,5 \times 10^5$ cel mL⁻¹), seguida de *Skeletonema* sp., (93×10^5 cel mL⁻¹) e *Thalassiosira* sp., (69×10^5 cel mL⁻¹).

Shei *et al.*, (2008) compararam o desempenho do cultivo da diatomácea *Chaetoceros calcitrans* usando diferentes tipos de água marinha artificial de três marcas comerciais (Oceanic, Red Sea, Coralife) e utilizando água marinha natural como controle. Com

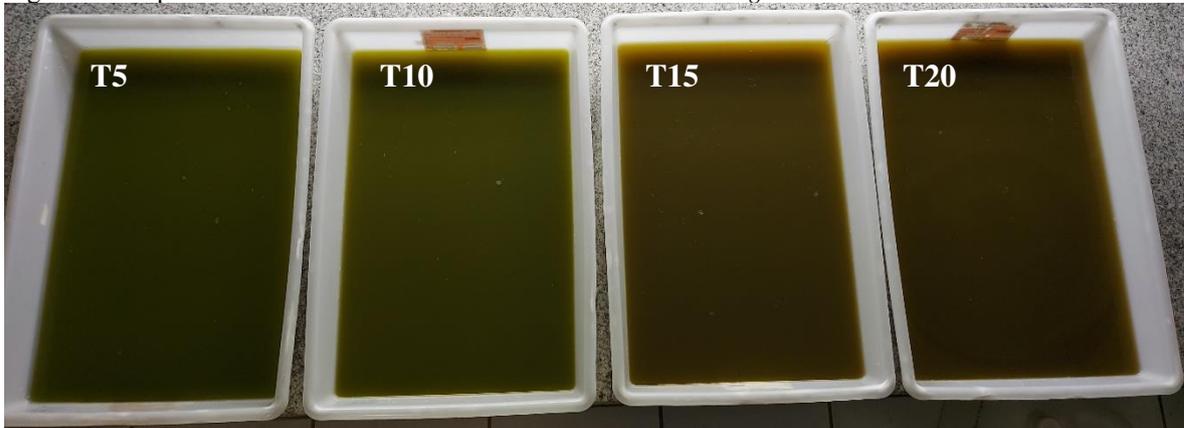
salinidade de 31 ppm, iluminação de 2.600 lux e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro e meio de cultura Conway modificado. Os resultados demonstraram crescimento superior da microalga quando cultivada utilizando água marinha artificial (Oceanic 700×10^4 cel mL⁻¹; Red Sea 680×10^4 e Coralife, 490×10^4 cel mL⁻¹) do que comparando ao crescimento em água marinha natural (DCM, 200×10^4 cel mL⁻¹).

Tokushima; Inoue-Kashino; Nakazato (2006) cultivaram as diatomáceas *Chaetoceros gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* em meio Guillard f/2 em diferentes concentrações de sal (0; 5; 10; 20; 30 e 40 ppt) e observaram que *C. gracilis* é altamente tolerante a variações de salinidade, crescendo em todas as faixas de salinidade, apresentando DCM no 10º dia, igual a $629 \pm 31 \times 10^4$ cél mL⁻¹ e $647 \pm 43 \times 10^4$ cél mL⁻¹ em 10 ppt e 20 ppt, respectivamente, chegando a $389 \pm 45 \times 10^4$ cél mL⁻¹ em 0 ppt, superiores aos obtidos em 30 ppt ($363 \pm 32 \times 10^4$ cél mL⁻¹) e 40 ppt ($271 \pm 23 \times 10^4$ cél mL⁻¹). Para *P. tricornutum* os maiores valores de DCM foram observados em 10 ppt e 20 ppt, iguais a $164 \pm 10 \times 10^5$ cél mL⁻¹ e $166 \pm 92 \times 10^5$ cél mL⁻¹, respectivamente, seguidos de 30 ppt ($149 \pm 1 \times 10^5$ cél mL⁻¹) e 40 ppt ($138 \pm 6 \times 10^5$ cél mL⁻¹), com a microalga não apresentando crescimento em 0 e 5 ppt.

3.2 Rendimento de biomassa

As biomassas úmidas, obtidas no T5 e T10, apresentaram uma tonalidade de cor mais esverdeada do que amarronzada (Figura 7). Essa diferença pode ter sido evidenciada devido ao estresse da diminuição na concentração salina, podendo ter gerado nas células uma má formação ou células mais frágeis devido ao gasto energético com necessidade de osmorregular (LOURENÇO, 2006).

Figura 7 – Aspecto da biomassa úmida da diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em diferentes salinidades

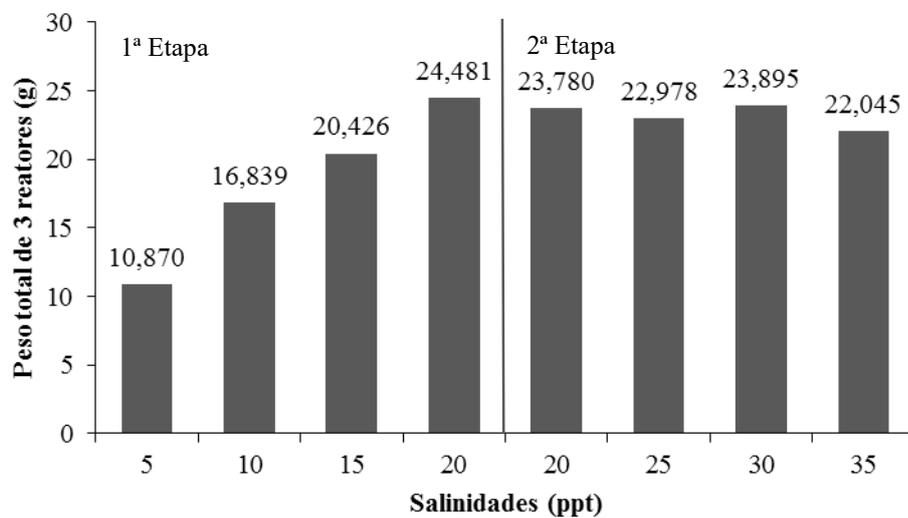


Fonte: Autor

O rendimento de biomassa seca foi obtido apenas como valor único para cada tratamento, não sendo possível a comparação estatística nos valores totais de produção de biomassa.

Os valores de biomassa seca para os tratamentos com salinidades inferiores foram 10,870 g; 16,839 g; 20,426 g e 24,481 g, respectivamente para T5, T10, T15 e T20. E para os tratamentos superiores os valores foram 23,780 g; 22,978 g; 23,895 g e 22,045 g para T20, T25, T30 e T35, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 – Peso total (3 reatores) de biomassa da diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em diferentes salinidades



Fonte: Autor

Os resultados de biomassa seca são bastante próximos, sendo evidente uma diferença de peso seco nos tratamentos com salinidades extremas (15 e 35 ppt), mudança que também foi evidenciada nos valores de crescimento por contagem e absorbência com diferenças estatísticas já mencionadas.

Minggat; Roseli; Tanaka (2021) cultivou *Chaetoceros muelleri* em diferentes salinidades 10, 15, 20, 25 e 30 ppt em meio Guillard f/2, com intensidade de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 7 dias. Por meio de análise de regressão, os autores estimaram que a produção máxima de biomassa seria alcançada na salinidade 27 ppt. No referido trabalho, a menor produção foi constatada na salinidade 10 ppt, ficando evidente que a salinidade ótima, para crescimento, ficou entre 25 e 30 ppt.

3.3 Quantificação de clorofila *a*, feofitina *a* e carotenóides totais

A Tabela 6 apresenta a composição de pigmentos fotossintéticos de *C. gracilis* cultivada em diferentes salinidades. Em ambas as etapas de cultivo, a primeira com salinidades inferiores a do controle (20 ppt) e a segunda com teor de sal superior ao controle não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre nenhum tratamento tanto para clorofila *a*, como para feofitina *a* e carotenóides totais. Na primeira etapa, a concentração nominal de clorofila *a* variou de $1,43 \pm 0,15$ a $1,82 \pm 0,13$ mg L⁻¹, respectivamente nos tratamentos T20 e T15, e na etapa 2 a variação foi de $1,18 \pm 0,15$ a $1,41 \pm 0,17$ mg L⁻¹, respectivamente em T25 e T35. Já para feofitina *a*, o valor mínimo observado, nas menores salinidades, foi de $2,30 \pm 0,28$ mg L⁻¹ (T5) e o máximo foi de $2,57 \pm 0,14$ mg L⁻¹ (T15); para as maiores salinidade os teores variaram de $1,95 \pm 0,12$ mg L⁻¹ (T30) a $2,14 \pm 0,11$ mg L⁻¹ (T35). No caso dos carotenóides totais, a concentração ficou entre $3,26 \pm 0,44$ mg L⁻¹ (T20) e $3,92 \pm 0,09$ mg L⁻¹ (T15) e entre $2,79 \pm 0,32$ mg L⁻¹ (T30) e $3,03 \pm 0,16$ mg L⁻¹ (T20), respectivamente para os tratamentos da primeira e segunda etapas. Desta forma foi possível verificar que a microalga produziu quantidades equivalentes de pigmentos mesmo em um ambiente de estresse osmótico como se observou nos tratamentos de salinidade inferiores, com maiores valores nominais obtidos em T15, para os três pigmentos fotossintéticos.

Tabela 6 – Composição de pigmentos fotossintéticos da diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em meio Guillard f/2 com diferentes salinidades

Tratamento		Clorofila <i>a</i> mg L ⁻¹	Feofitina <i>a</i> mg L ⁻¹	Carotenóides totais mg L ⁻¹
1ª Etapa	T5	$1,63 \pm 0,12^a$	$2,30 \pm 0,28^a$	$3,41 \pm 0,02^a$
	T10	$1,50 \pm 0,15^a$	$2,46 \pm 0,09^a$	$3,49 \pm 0,16^a$
	T15	$1,82 \pm 0,18^a$	$2,57 \pm 0,14^a$	$3,92 \pm 0,09^a$
	T20	$1,43 \pm 0,15^a$	$2,35 \pm 0,05^a$	$3,26 \pm 0,44^a$
2ª Etapa	T20	$1,31 \pm 0,08^a$	$2,14 \pm 0,11^a$	$3,03 \pm 0,16^a$
	T25	$1,18 \pm 0,15^a$	$1,97 \pm 0,09^a$	$2,83 \pm 0,25^a$
	T30	$1,38 \pm 0,09^a$	$1,95 \pm 0,12^a$	$2,79 \pm 0,32^a$
	T35	$1,41 \pm 0,17^a$	$1,99 \pm 0,26^a$	$3,18 \pm 0,02^a$

Fonte: Elaborado pelo Autor

Letras distintas, dentro de cada coluna e etapa, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

A determinação dos teores de clorofila *a* possibilita estimar a biomassa fitoplanctônica e os feopigmentos indicam o seu grau fisiológico, pois, em uma população em declínio, o teor de clorofila *a* diminui, enquanto que seus produtos de degradação (feopigmentos) assim como os carotenóides aumentam. Isso ocorre porque as clorofilas são facilmente alteradas por variações no meio, tais como pH, incidência luminosa, temperatura, entre outros, tendo como produto desta alteração, a feofitina (GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978).

Junior *et al.* (2006) cultivaram as microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Thalassiosira* sp. e *Isocrysis galbana* no meio Guillard f/2, utilizando lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia e temperatura de 18 °C e obtiveram valores de clorofila *a* iguais a $3,74 \pm 0,26$, $0,96 \pm 0,08$ e $1,87 \pm 0,08$ mg L⁻¹, respectivamente. A concentração observada pelo referido autor, foi duas vezes maior que a determinada no presente trabalho, este resultado provavelmente está relacionada a utilização de uma fonte de luz diferente e temperatura mais baixa, apesar de o mesmo não mencionar a salinidade do meio, mas por se tratar de uma espécie halotolerante, possivelmente a salinidade utilizada deve estar entre 5 e 40 ppt.

Luche; Gonçalves; Silva, 2020 cultivaram *Chlorella minutíssima* em meio Guillard f/2 com adição de mel e em baixo nível de iluminação e conseguiu 9,43 mg L⁻¹ de clorofila *a*, nível extremamente superior ao encontrado no presente trabalho. Os autores relataram que este valor foi devido ao nível baixo de iluminação que levou a espécie a aumentar a quantidade de clorofila para aumentar a capacidade fotossintética. E o uso do mel como fonte de carbono orgânico proveu energia durante o experimento.

Sigaud-Kutner e Aidar (1993) avaliaram o efeito da variação de salinidade (0-40 ppt) sobre a concentração de clorofila *a* em *Chaetoceros* sp. e verificaram que nas salinidades mais baixas (<15 ppt) havia tendência de aumento na concentração de clorofila *a* mas, sem diferença estatística, concluindo que o conteúdo de clorofila não se associou a variação de salinidade.

Liang *et al.* (2014) avaliaram o efeito do estresse salino (1-70 ppt) no teor relativo de clorofila, por fluorescência, e *C. gracilis*. Eles observaram que, entre as salinidades 5 e 40 ppt, não ocorreu diferença estatística tanto para o crescimento celular como para a concentração de clorofila, entretanto, mas faixas de salinidade fora deste intervalo observaram menor teor de clorofila, fato atribuído à redução do crescimento.

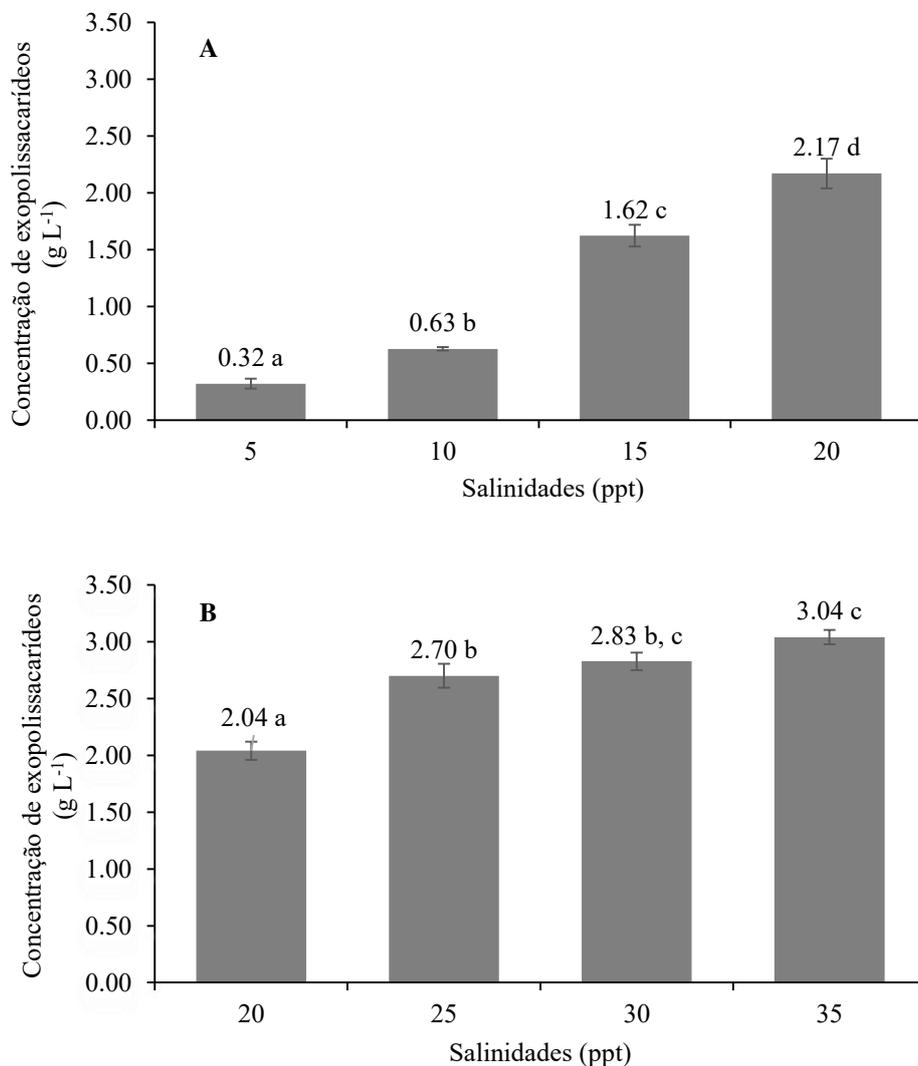
No presente trabalho, as maiores concentrações nominais de carotenoides foram observadas em *C. gracilis* cultivada em salinidades inferiores a 20 ppt, entretanto Minhas *et al.* (2016) afirmam que, normalmente, o aumento do teor de sal no meio de cultura estimula o maior acúmulo de carotenoides, a pesar de alertarem que, deve-se tomar cuidado, uma vez que o excesso de sal pode danificar o metabolismo das espécies.

Fré, Rech e Marcílio (2014) avaliaram a influência da luminosidade e concentração de sal na produção de carotenoides em *Dunaliella tertiolecta*, e observaram que quanto maiores as condições de estresse salino e luminoso, após a fase de crescimento, maior foi a síntese de carotenoides com teores atingindo 5,08 mg L⁻¹, valor superior aos reportados no presente trabalho, entretanto, no mesmo, *C. gracilis* sofreu apenas estresse salino.

3.4 Quantificação de exopolissacarídeos

Tanto na primeira como na segunda etapa de cultivo, foi possível constatar que o aumento da salinidade influenciou diretamente, de maneira positiva, na concentração de exopolissacarídeos, com diferença estatística ($p \leq 0,05$), dentro de cada etapa, como apresentado na Figuras 9.

Figura 9 – Concentração de exopolissacarídeos (g L^{-1}) produzido pela diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em diferentes salinidades



Fonte: Elaborado pelo Autor

A- cultivo da etapa 1 – realizado com salinidades inferiores a 20 ppt; B - cultivo da etapa 2 – realizado com salinidades inferiores

Na primeira etapa (cultivo nas menores salinidades), as concentrações de EPS variaram de $0,32 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$, em T5; a $2,17 \pm 0,013 \text{ g L}^{-1}$, em T20, sendo este último sete vezes superior ao primeiro (Figura 9A). Na segunda, os valores observados foram superiores aos da primeira, entretanto a variação na concentração foi mais discreta, com valores oscilando entre $2,04 \pm 0,08$ a $3,04 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente em T20 e T35 (Figura 9B).

Holanda (2017) cultivou *Chaetoceros muelleri* em meio Guillard f/2 e em efluente de carcinicultura, em 2.378 lux e temperatura de 28° C , por 10 dias, na salinidade de 30 ppt e obteve $2,68 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ e $2,80 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ de EPS, respectivamente. Ele enfatizou que a partir da depleção dos nutrientes nitrogenados a microalga começou a acumular EPS no cultivo, tais valores foram semelhantes aos observados no presente trabalho nas salinidades 25 e 30 ppt, entretanto obtidos com 7 dias de cultivo.

Mendonça (2016) cultivou, durante 24 dias, *Porphyridium cruentum*, uma Rhodophyceae, nas salinidades 18; 32 e 50 ppt e obteve $115,5 \pm 21,5$, $149,8 \pm 22,5$ e $78,4 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ de exopolissacarídeos, valores demasiadamente superiores aos do presente trabalho, entretanto diferentemente do observado no mesmo, a menor concentração foi identificada na maior salinidade.

Bemal e Anil (2018) avaliaram a produção de EPS de *Synechococcus* sp., cultivada em diferentes salinidades (0, 10, 20 e 30 ppt), e observaram que a cianobactéria sofreu estresse a partir da salinidade 10 ppt, com redução de crescimento, mas com aumento na produção de exopolissacarídeos à medida que a salinidade crescia.

Ascencio (2004) quantificou exopolissacarídeos da diatomácea marinha *Coscinodiscus wailessi*, através de extração aquosa a 80° C , e obteve 31 mg L^{-1} , mais de 80 vezes inferior aos observados na 2ª etapa do presente trabalho. Esta diferença pode estar relacionada à espécie, aos parâmetros de cultivo e/ou metodologia de extração utilizada.

O aumento de produção e acúmulo de EPS nos cultivos de microalgas comumente ocorrem a partir do momento que há limitação de nutrientes (DULSINI, 1996; GAIGNARD *et al*, 2018). A variação de EPS, ocasionada pelos diferentes meios de cultura, influencia primeiramente a taxa de crescimento e por consequência, a velocidade de depleção dos nutrientes que induz a produção dos EPS (HOLANDA, 2017).

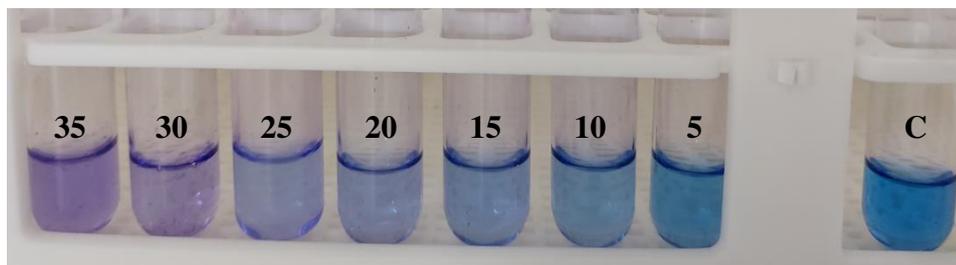
3.5 Avaliação do ensaio de metacromasia

ADM é um corante catiônico que por afinidade forma um complexo colorimétrico com os EPS que possuem caráter aniônico. Essa interação com os EPs do tipo sulfatados apresentam uma mudança de cor do azul escuro para um rosa mais claro (FARNDAL; BUTTLE; BARRET, 1986).

O ensaio funcionou de forma progressiva acumulativa das amostras de EPs preparadas, acrescentadas nos tubos contendo 1 mL de corante ADM até a indicação por mudança de cor, com acréscimo inicial de 3 μ L em todas as amostras como 1º ensaio. No segundo ensaio, mais 3 μ L num acumulado de 6 μ L. No terceiro ensaio acréscimo de 10 μ L, assim como no 4º ensaio, acumulando ao todo 26 μ L mas sem nenhuma alteração colorimétrica. Um quinto ensaio foi realizado acrescentado 24 μ L afim de acumular 50 μ L ao qual demonstrou uma leve alteração colorimétrica. Por fim, foi realizado um sexto ensaio com acréscimo de 50 μ L, ou seja, dobrando a quantidade já existente para 100 μ L.

Na análise, foi possível observar uma leve mudança de coloração apenas nos exopolissacarídeos do T30 e T35, com 100 μ L de EPs (Figura 10). Indicando uma possível alteração na composição química dos EPs nas salinidades, assim sendo necessário pesquisas mais específicas.

Figura 10 – Ensaio de metacromasia usando o corante catiônico ADM na presença de 100 μ L (1,5 mg de EPs) da solução de exopolissacarídeos produzidos pela diatomácea *Chaetoceros gracilis* cultivada em diferentes salinidades



Fonte: Autor

A literatura aponta que a salinidade tem um papel indutor na expressão de genes na sulfatação (AQUINO *et al*, 2005), com o resultado obtido na figura 10 demonstra que o aumento da salinidade induziu a produção de sulfatação nos EPs.

4 CONCLUSÃO

A microalga *Chaetoceros gracilis* é capaz de crescer em uma ampla faixa de salinidade, apresentando tendência de crescimento e biomassa seca melhor em salinidades acima 15 ppt, especialmente em 20 e 25 ppt. Em salinidades inferiores (5 e 10 ppt) a microalga apresentou crescimento reduzido, provavelmente devido à baixa na capacidade fisiológica que a alga sofreu para manter os níveis normais de metabolismo (evidenciados no crescimento celular).

A variação de salinidade no cultivo da diatomácea *Chaetoceros gracilis* não influenciou na produção de pigmentos (clorofila *a*, feofitina *a* e carotenóides totais). Entretanto, a produção de exopolissacarídeos foi diretamente influenciada pela variação de salinidade no cultivo da microalga *C. gracilis*. E, segundo o ensaio de metacromasia, foi possível sugerir para uma discreta composição de sulfato nos polissacarídeos liberados pela microalga quando cultivada nas salinidades de 30 e 35 ppm.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.; CID, A.; PAREDES, J; VAAMONDE, J.; CONCEPCIÓN, H. **Microalgas: Cultivo y aplicaciones**. Universidade da Coruña: Coruña, 1995.
- AQUINO, L.M. **Xantofilas marinhas bioativas: fucoxantina e astaxantina, uma revisão das suas atividades biológicas**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.
- AQUINO, R. S; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M; VALENTE, A. P; ANDRADE I, R; MOURÃO, P. A. S; Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycoobiology*, v. 15 (1), p. 11-20, 2005.
- ARANZADI, E. *et al.* Evaluación del test del azul de dimetilmetileno (DMB) en el screening de las mucopolisacaridos y su comparación con la prueba del cetilpiridinio (CPC)/Dimethylmethylene (DMB) test in the screening of mucopolysaccharidosis compared with cetylpyridinium chloride (CPC) technique. **Revista de Diagnóstico Biológico**, v. 55, n. 1, p. 17-21, 2006.
- ARMBRUST, E. The life of diatoms in the world's oceans. **Nature**, v. 459, p. 85–192, 2009.
- ASCENCIO, P.G. M. **Diatomácea marinha *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst (Bacillariophyceae): isolamento, cultivo e estudo dos polissacarídeos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- ASULABHA, 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. **Lake 2012: National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems**, Kerala, 6th -9th Nov. 2012.
- BARROS, M.U.G. **Efeito da salinidade no teor de lipídios produzidos pela microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898)**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BECKER, E.W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. **Hanbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 312-351, 2004.
- BEHRENS, P.W.; KYLE, D.J. Microalgae as a source of fatty acids. **Journal of Food Lipid**, v. 3, p. 259-272, 1996.
- BEMAL, S. ANIL, A. Effects of salinity on cellular growth and exopolysaccharide production of freshwater *Synechococcus* strain CCAP1405. **Journal of Plankton Research**, v.40, p. 1-13, 2017.
- BERG, M.; SUTULA, M. Factors affecting the growth of cyanobacteria with special emphasis on the Sacramento-San Joaquin Delta. **Southern California Coastal Water Research Project**, Technical Report 869, 2015.

BHATTACHARJYA, R.; MARELLA, T.K.; TIWARI, A.; SAXENA, A.; SINGH, P.K.; MISHRA, B. Bioprospecting of marine diatoms *Thalassiosira*, *Skeletonema* and *Chaetoceros* for lipids and other value-added products. **Bioresource Technology**, v. 318; 2020.

BOROWITZKA, M. Algal biotechnology products and processes matching science and economics. **Journal of applied phycology**, v. 4, n. 3, p. 267-279, 1992.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press: Cambridge, 1988.

BROWN M, R.; BLACKBURN, S, I. Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. In: Allan, G.; Burnell, G.; Ed. **Advances in aquaculture hatchery technology**. Woodhead Publishing: Cambridge, p. 117–156, 2013.

CARVALHO, J; MIYAWAKI, B.; **Capítulo 6. Perspectivas futuras**. In: MIYAWAKI *et al.* Tratamento de emissões poluentes por microalgas em fotobiorreatores. 1. ed. Curitiba: Grafo Estúdio,p. 99-104, 2020.

CAVALCANTI, D. Potencial biotecnológico de *Chlorella vulgaris*: aplicação em biocélulas a combustível fotossintética, produção de energia e sequestro de CO₂. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **CETESB – L5.306**: Determinação de Clorofila *a* e Feofitina *a*: método espectrofotométrico. São Paulo: CETESB, 2014.

CORDERO-ESQUIVEL, B. *et al.* Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 18, p. 213-218, 1996.

DAPHNE, H.P.; NG, Y.K.; SHEN, H.; LEE, Y. Microalgal biotechnology: the way forward. In: KIM, S. K. **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. Busan: Pukyong National University, p. 69-80,2015.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 22, p. 151-175, 1998.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, Clermont-Ferrand, v. 34, p. 1159–1179, 2016.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; de CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DISCART, V. BILAD M.R.; MARBELIA, L.; VANKELECOM, I.F. Impact of changes in broth composition on *Chlorella vulgaris* cultivation in a membrane photobioreactor (MPBR) with permeate recycle. **Bioresource Technology**, p. 152-321, 2014.

DOGRA, B.; AMNA, S.; PARK, Y.; PARK, J. K. Biochemical Properties of Water Soluble Polysaccharides from photosynthetic marine microalgae *Tetraselmis* species. **Macromolecular Research**, Gyeonggi, v. 25, p. 172-179, 2017.

DULSINI, S. E. M. Produção de exopolissacarídeos em diferentes fases de crescimento de *Staurastrum tohopekaligiensis* Wolle (Chlorophyceae). 1996. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 1996.

ESPINAL, E.O.C; PORTILLO, R.G; MARTÍNEZ, M.A. Comparación de tres salinidades para evaluar el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros muelleri*. **Revista Ciencia y Tecnología**, v. 1, n. 16, p. 36–49, 2015.

FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Seaweeds and microalgae: An overview for unlocking their potential in global aquaculture development. n. 1229. 2021.

FARNDAL, R. W; BUTTLE, D. J; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, p. 173-17, 1986.

FIELD C.B.; BEHRENFELD, M.J.; RANDERSON, J.T.; FALKOWSKI, P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v. 281, n. 5374, 237-240, 1998.

FRÉ, N.C.; RECH, R.; MARCÍLIO, N.R. Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014. 19 a 22 de outubro 2014. Florianópolis/SC.

GAINARD, C.; LAROCHE, C.; PIERRE, G.; DUBESSAY, P.; DELATTRE, C.; GARDARIN, C.; GOURVIL, P.; ROBERT, I.; DUBUFFET, A.; MICHAUD, P. Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producer. **Algal Research**, v. 44, 2019.

GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A. M. Methods for physical and chemical analysis of freshwaters: Oxford. Blackwell Scientific Publications, v.I.B.P. Handbook. 8. 1978. 213 p.

GUEDES, C. A; MALCATA, X. F. Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. **Aquaculture**, v. 413, p. 59-79, 2012.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Eds.). **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Plenum, p. 29-60, 1975.

GUZMÁN-MURILLO, M. A.; ASCENCIO, F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of the red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. **Letters in Applied Microbiology**, La Paz, v. 30, p. 473–478, 2000.

HASLE, G.R.; SYVEETSEN, E.E. **Marine Diatoms. Identifying Marine Phytoplankton.** Academic Press, San Diego, USA. 1996.

HASSAN, M.M.; PARKS, V.; LARAMORE, S. Optimizing microalgae diets for hard clam, *Mercenaria mercenaria*, larvae culture. **Aquaculture Reports.** v. 20, 2021.

HASTINGS, J. *et al.* ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. **Nucleic Acids Research,** v. 44, n. D1, p. D1214-D1219, 2016.

HERNADEZ, J. P.; de-BASHAN, L. E.; RODRIGUEZ, D. J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology,** v. 45, n. 1, p. 88-93, Jan 2009.

HOLANDA, C.L.B. **Cultivo da microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) em efluente de carcinicultura e seu efeito na qualidade de água, produção de lipídeos e exopolissacarídeos.** 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

HUFLEJT, M.E.; TREMOLIERES, A.; PINEAU, B.; LANG, J.K.; HATHEWAY, J.; PACKER, L. Changes in membrane lipid composition during saline growth of the fresh water Cyanobacterium *synechococcus*, **Plant Physiology,** v. 94, n. 4, p. 1512–1521, Dec.1990.

IGLESIAS, M.J.; *et al.* NMR characterization and evaluation of antibacterial and anti-biofilm activity of organic extracts from stationary phase batch cultures of five marine microalgae (*Dunaliella* sp., *D. salina*, *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* and *Tisochrysis lutea*), **Phytochemistry,** v 164, p 192-205, 2019.

ISHIKA, T.; LAIRD, D. W.; BAHRI, P.A.; MOHEMANI, N.R. Co-cultivation and stepwise cultivation of *Chaetoceros muelleri* and *Amphora* sp. for fucoxanthin production under gradual salinity increase. **Journal Applied of Phycology,** v. 31, p 1535-1544, 2019.

ISHIKA, T; NAVID R. MOHEIMANI, PARISA A. BAHRI, DAMIAN W. LAIRD, SANDRA BLAIR, DAVID PARLEVLIET. Halo-adapted microalgae for fucoxanthin production: Effect of incremental increase in salinity, **Algal Research,** v 28, 2017, p 66-73, 2017.

JUNIOR, A.M.M.; NETO, E.B.; KOENING, M.L.; LEÇA, E.E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle1. **Revista Ciência Agronômica.** v. 37, n. 2, p. 142-148, 2006.

KALE, A.; KARTHICK, B. The Diatoms. **Resonance,** v. 20, p. 919-930, 2015.

KHOMUTOV, G.; FRY; I.V.; HUFLEJT, M.E; PACKER, L. Membrane lipid composition, fluidity, and surface charge changes in response to growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311 under high salinity. **Arch Biochem Biophys,** v. 277, n. 2, p. 263-267, 1990.

- LEVITAN, O.; DINAMARCA, J.; HOCHMAN, G.; FALKOWSKI, P.G. Diatoms: a fossil fuel of the future. **Trends Biotechnol**, v. 32, n. 3 p. 117-124, Mar. 2014.
- LIANG, Y.; SUN, M.; TIAN, C.; CAO, C.; LI, Z. Effects of salinity stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). **Botanica Marina**, v. 57, n. 6, p. 469-476, 2014.
- LÓPEZ-ELÍAS, J.A.; *et al.*, Growth and biomass production of *Chaetoceros muelleri* in mass outdoor cultures: Effect of the hour of the inoculation, size of the inoculum and culture medium. **Revista de investigaciones marinas**, v. 29, n. 2, p. 171-177, 2008
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.
- LUCHE, D.E.D.; GONÇALVES, B.C.M.; SILVA, M.B. Crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em presença do antifúngico fluconazol. III SENGI - Simpósio de Engenharia, Gestão e Inovação, São Paulo, ago, 2020.
- MARAN, J. P.; MEKALA, V.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. **Carbohydrate Polymers**, Harbin, v. 92, p. 2018-2026, 2013.
- MARINHO, Y.F.; SANTOS, A.P.F.; SANTOS, L.B. G.; VASCONCELOS, R.F.L.; KALAZANS, N.K.F.; NASCIMENTO, R.D.M.; DANTAS, D.M.M.; GÁLVEZ, A.O. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria prima do biodiesel, **Eventos UFRPE**, 2009.
- MARROQUIN, J.F.R. **O uso da espectroscopia óptica na diferenciação e caracterização de microalgas**. 2020. Dissertação (Mestrado em Física), Universidade de Brasília, Brasília, 2020.
- MENDONÇA, I. V. Efeito da salinidade na produção de exopolissacarídeos pela microalga *Porphyridium cruentum*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto Superior Técnico, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2016.
- MINGGAT, E.; ROSELI, W.; TANAKA, Y. Nutrient Absorption and Biomass Production by the Marine Diatom *Chaetoceros muelleri*: Effects of temperature, salinity, photoperiod, and light intensity. **Journal of Ecological Engineering**, v. 22, n. 1, p. 231-240, 2021.
- MINHAS, A.K.; HODGSON, P.; BARROW, C.J.; ADHOLEYA, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. **Front. Microbiol.** v. 7, Article 546, 2016.
- MOREIRA, R.T. **Planctologia e a Produção de Alimento Vivo**. Ed. 1 Carlos: Rima, 2021. 208 p
- MOREIRA, R.T.; **Avaliação do efeito dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Dunaliella tertiolecta* como imunostimulante em juvenis de camarão *Litopenaeus vannamei***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

- MORENO, J.; VARGAS, M.A.; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.60, p.175-182, 1998.
- MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. S. V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 493-506, 2017.
- MÜLLER, G.; HANSCHKE, M. Quantitative and qualitative analysis of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue, **Connective tissue Research**, v. 33, n. 4, p. 243-248, 1996.
- NETO, D.C.; PINOTTI, M.H.P. Exopolissacarídeos de cianobactérias. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 43-52, jan./jun, 2004.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.
- ORONA-NAVAR, A.; AGUILAR-HERNÁNDEZ, I.; NIGAM, K.D.P.; CERDÁN-PASARÁN, A.; ORNELAS-SOTO, N. Alternative sources of natural pigments for dye-sensitized solar cells: algae, cyanobacteria, bacteria, archaea and fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 332, p. 29-53, 2021.
- OSHE, S.; DENNER, R.B. OZÓRIO, R.A.; CUNHA, P.C.R.; LAMARCA, C.P.; SANTOS, M. E.; MENDES, L.B.B. Revisão: Seqüestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA – Revista de Botânica**, n.36, p. 39-74, 2007.
- OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p.143-153, 2003.
- OTOBONI, A.M.M,B. Estudo de exopolissacarídeos de bactérias fitopatogênicas. *Revista Científica Eletônica de Agronomia*, v. 6, n. 11, 2007
- PAL, S.W.; SINGH, N.K.; AZAM, K. Evaluation of Relationship between Light Intensity (Lux) and Growth of *Chaetoceros muelleri*. **Journal of Oceanography and Marine Research**, v. 1, n. 3, 2013.
- PARK, G.T.; GO, RE.; LEE, H.M. *et al.* Potential anti-proliferative and immunomodulatory effects of marine microalgal exopolysaccharide on various human cancer cells and lymphocytes in vitro. **Marine Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 36-146, Apr 2017.
- PATEL, A.; GAMI, B.; PATEL, P.; PATEL, B. Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 535–547, 2017.
- PEREIRA, W.G. **Efeito da salinidade sobre teor de lipídeos na microalga marinha *Isochrysis galbana* para fins biotecnológicos**. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

PHILIPPINI, R.R. **Produção de exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas**. 2017. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PINA, L.C.C., *et al.* Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubulares e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37734-37777, 2021.

PULZ, O., GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p. 635–648, 2004.

RAPOSO, M.F.J.; MORAIS, M.R.C.; MORAIS, A.M. B. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. **Marine Drugs**, Porto, v. 11, p. 233-252, 2013.

RASTOGI, R.P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C.; MADAMWAR, D. Algal Green Energy – R&D and technological perspectives for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2946–2969, Aug. 2017, 2018.

RICHMOND, A. CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. 1st ed. CRC Press, 1986, 536 p.

RICHMOND, A. **Hanbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2003.

ROY, S.S; PAL, R. Microalgae in aquiculture: A review with special references to nutritional value and fish diets. **Zoological Society**, Calcutá, v. 68, p. 1- 8, 2015.

SANTOS, C.C.A. **Avaliação do efeito das condições de cultivo na produção de biomassa e lipídeos da microalga *Halamphora coffeaeformis***. 2019. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente, Águas e Saneamento). Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia; Salvador, 2019.

SHEI, M.R.P; BARRETO, O.J.S.; BONFANTE, T.M.; BASTOS, G.C.C. Cultivo da microalga marinha *Chaetoceros calcitrans* (BACILLARIOPHYCEAE) utilizando diferentes tipos de água marinha artificial. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, n.4, p.563-569, 2008.

SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; AIDAR, E. Salinity and temperature effects on the growth and chlorophyll-a content of some planktonic algae. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 41, n. 1-2, p. 95-103, 1993.

SMOL, J.P.; STOERMER, E.F. **The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences**, Ed. 2. Cambridge University Press, 2010, 667 p.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of Microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STREIT, M.; CANTERLE, P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.). As clorofilas. **Ciência Rural**. v 35, n. 3, p.748-755, 2005.

SUDHIR, P.; MURTHY, S. Efeitos do estresse salino em processos básicos de fotossíntese. **Photosynthetica** v. 42, p. 481-486, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Limerick, v.16, p.41-46, 1998.

TACHIYAMA, S. et al. High Productivity of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin by a marine diatom *Chaetoceros gracilis* in a semi-continuous culture. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

TAFRESHI, A.H.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 14-35, Jul. 2009.

TANG, N.; ZHOU, F.; ZHAORUI, G.; ZHENG, H.; YU, Z.; ZHENG, B. Unsupervised Pixel-wise Classification for *Chaetoceros* Image Segmentation, **Neurocomputing**, 2018.

TOKUSHIMA, H., INOUE-KASHINO, N., NAKAZATO, Y. Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, n. 235, 2016.

VENKATESAN, J.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S.K. Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. In: KIM, S.K. (ed.). **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. Cambridge: Academic Press, p. 1-9. 20015.

WEINER, R.; LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.339-346, 1995.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances**, Anderson, v.34, p. 1225–1244, 2016.

YANG, J; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresour Technol**, Atlanta, v. 102, p. 159-165, 2011.

YU, Y.; HU, H.Y.; LI, X.; WU, Y.H.; ZHANG, X; JIA, S.L. Accumulation characteristics of soluble algal products (SAP) by a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 during batch cultivation for biofuel production. **Bioresour Technol**, v. 110, p. 184-189, 2012.

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; ROCAM, M. Catabolism and bioactivity properties of chlorophylls. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 94-100, 2019.

ZHANG, J.; LIU, L.; REN, Y.; CHEN, F. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 761-767, 2019.

ZIEGLE, R, *et al.* Importance of α -carotene, β -carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. JNCI: **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 9, p. 612-615, 1996.