



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

TIAGO SILVA GONDIM

**EFEITOS DO STRESS SALINO SOBRE A MICROALGA, *Dunaliella salina*
ISOLADA DE SEU HABITAT NATURAL**

MOSSORÓ

2023

TIAGO SILVA GONDIM

**EFEITOS DO STRESS SALINO SOBRE A MICROALGA, *Dunaliella salina*
ISOLADA DE SEU HABITAT NATURAL**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro Ribeiro Freire Nunes Cacho.

Coorientadora: Ms. Terezinha Lúcia dos Santos.

MOSSORÓ

2023

©Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

G637e Gondim, Tiago Silva.
Efeitos do stress salino sobre a microalga,
Dunaliella salina isolada de seu habitat natural
/ Tiago Silva Gondim. - 2023.
36 f. : il.

Orientadora: Maria do Socorro Ribeiro Freire
Nunes Cacho.
Coorientadora: Terezinha Lucia dos Santos.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Engenharia de
Pesca, 2023.

1. Microalgas. 2. Bioprospecção. 3. Salina
Solar. 4. Sustentabilidade. 5. Carotenoides. I.
Cacho, Maria do Socorro Ribeiro Freire Nunes,
orient. II. Santos, Terezinha Lucia dos , co-
orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

TIAGO SILVA GONDIM

**EFEITOS DO STRESS SALINO SOBRE A MICROALGA, *Dunaliella salina*
ISOLADA DE SEU HABITAT NATURAL**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Pesca

Defendida em: 17 / 05 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Socorro Ribeiro Freire Nunes Cacho (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. José William Alves da Silva (IFCE - Aracati)
Membro Examinador

Ms. Dilma Bezerra Fernandes de Oliveira
Membro Examinador

*A minha eterna e amada vovó Mocinha (In
Memoriam).*

*A Jesus Cristo (presente), E a todas as pessoas com Transtorno de Déficit de Atenção e
Hiperatividade - somos capazes!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus Cristo, por tudo!

Agradeço ao meu pai, Paulo Cesar da Silva Gondim e a minha mãe, Maria Marta da Silva de Sousa, por sempre me apoiarem e em especial, durante essa trajetória. Eles foram a principal motivação para que eu chegasse até aqui.

Agradeço as minhas irmãs: Naele, Natiele, Natali e Isabelle, por todo o apoio e incentivo durante esses 7 longos anos. Aos meus cunhados: Silas, Galego e Marilene, pelas incontáveis caronas para casa. Aos meus sobrinhos: Ana Alicia e Joaquim, pois seus sorrisos irradiam a minha vida. As minhas tias: Mariinha e Sueli, pela ajuda e assistência recebidas. E a minha madrinha, Raimunda Lucia. Não tenho palavras para agradecer-la por tudo que fez por mim.

A minha orientadora, Dra. Maria do Socorro R. F. Cacho, que sempre se dispôs a me auxiliar, desde as disciplinas iniciais do curso até a conclusão deste Trabalho. Seu compromisso com a docência fortalece cada vez mais o pressuposto de que um trabalho nunca se desenvolve individualmente, mas sim a partir das relações que o permeiam. Portanto, quero agradecer a Professora Socorro, por fazer parte de minha trajetória de formação acadêmica e humana e pelo desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso, tão importante para minha vida. Professora, agradeço-lhe pela acolhida no LAQUIPLANC, pela oportunidade de trabalharmos juntos e por nos tornarmos grandes amigos. Agradeço-lhe também, pela estimulação de minha atividade criativa e espontânea e pelo desenvolvimento e valorização de meus talentos na área da Planctologia.

À minha coorientadora, Terezinha Lúcia Santos, agradeço-lhe por todos os ensinamentos e pelo aprendizado obtido, durante a execução deste trabalho.

À minha grande amiga, Bruna Vieira Batista, por todo o empenho na execução das tarefas relacionadas a este trabalho. Sou grato, do fundo do coração. Sem a ajuda dela, dificilmente teria concluído o trabalho em tempo hábil.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido, por ter me proporcionado ótimas experiências, que me tornaram um ser humano melhor; e por ter me concedido o privilégio de conhecer pessoas incríveis que levarei pelo resto da vida. Um agradecimento especial a Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis, pelo trabalho relacionado ao programa de assistência estudantil, do qual fui beneficiário.

À professora Dra. Jailma Suerda, pela grande contribuição no desenvolvimento das análises estatísticas deste trabalho.

Ao professor Dr. Renato Rocha, pela contribuição na identificação da espécie do gênero *Dunaliella* e por compartilhar seu amplo conhecimento na área do cultivo de microalgas halofílicas.

Ao professor Dr. William Alves, pelo apoio e conhecimentos repassados, durante a realização deste estudo.

Aos técnicos de laboratório: Luis Carlos e Karol, pela disposição em colaborar na realização das análises deste trabalho e pelas inúmeras vezes em que utilizei os equipamentos/reagentes dos laboratórios em que trabalham.

Aos professores amigos do Curso de Engenharia de Pesca da UFERSA, Junior Bessa, Ivanilson Maia, Pedro Martins, Rogério Taygra e Humberto Hazin, por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências de vida, contribuindo sobremaneira para minha formação profissional.

Agradeço as minhas amigas do LABMOL: Janaina Honória, Viviana Andrade, e a Profa. Dra. Inês Martins. Sou muito grato a Janaina (bruta) e Vivi (louca), por estarem comigo do início ao fim dessa trajetória (via dolorosa), que inclui, inúmeras noites de estudo no laboratório, cafés fortes (levanta defunto), pouquíssimo sono, muitas gargalhadas e incontáveis momentos de cuidado e partilha. Amo-vos!

Aos irmãos da Assembleia de Deus, no Tanque Salgado, por todas as orações, palavras de ânimo, e até mesmo ajuda financeira. E a Igreja Batista Regular da Fé, em Mossoró, pela acolhida, comunhão e Palavra.

As minhas amigas: Ana Claudia, Carmilene, Kaline, Janiele, Soraia, Florzinha e Lenilda, por todos os cafés da tarde durante o período pandêmico e pós pandemia e por todo o amor e apoio que recebi durante esse tempo de graduação.

Ao meu amigo e irmão, Moisés Sabóia, que sempre esteve apto a me ouvir, entender, apoiar e incentivar. Afinal, se hoje estou concluindo a graduação, foi devido a muita insistência dele para que eu viesse a UFERSA. Grato; por tudo! Amo-te!

Ao meu amigo e amor, Lucas Batista, por estar ao meu lado, me apoiando e auxiliando em todos os momentos deste TCC.

Aos amigos e amigas da Vila Acadêmica da UFERSA: Leandro Alves, Victor Gurgel, Anderson Mateus (Bebé), Elias Gomes, Eduardo Dantas, Marcondes Junior, Thales, Will, Emanuel Gomes, Canindé, Rayr Cesar, Pedro Góis, Arthur, Weverton, Helena (Netinha), Beatriz Pereira (Bia), Helena Aguirre, Erika Maia, Sandra, Andreza e Geruza, com quem compartilhei bons momentos e obtive auxílio nos momentos de dificuldade.

Ao grupo Conhecendo a Cristo, onde sempre encontrei paz e refúgio durante os momentos turbulentos da graduação.

As minhas psicólogas: Mônica Almeida e Mariana Delfino, por todo apoio, assistência e paciência que tiveram comigo. E ao meu psiquiatra: Dr. Rodrigo Aquino. Foram pessoas essenciais para que eu conseguisse concluir esta trajetória.

Agradeço aos meus amigos do Programa de Educação Tutorial: Laryssa Teles, Fernando Neves, Isabela Guilherme, Dalvanice Lima, Hudhro Araújo, Mylla Luziane, Julia Rebouças e Ingrid, por todo o companheirismo e apoio durante o período que fiz parte do Programa.

Agradeço aos meus amigos da PROAQUA JR: Paulo Matheus, Luis Cayky, Vinicius Barbosa, Hiza Marielly, Elmo Junior, Nilgleane Costa, Jose Mireya, Dayane Uchoa e Wilson Neto. Pude vivenciar momentos incríveis e desafiadores com eles durante o período que participamos do Movimento Empresa Junior.

Aos meus amigos de graduação da UFERSA: Valdenizia (Dê), André Luiz, João Luiz, Jessé Carneiro, Walber Ferreira, Dayane Hellen, Lucas Carlos, Emerson Augusto, Cicero Rodrigues, Jeferson Olanson, Lieberth, Luiz Guilherme, Camily Vieira, Thais Saldanha, Romeika Hellen (Fina), Manoel Messias, Lucas Thales, Jezualdo Cacho, Diogo Fernandes, Vêritas Rodrigues, Mikael Cruz, Jetty e Andreina.

Aos amigos do Laboratório de Multiusuários: Germana Rebouças, Bruno Vinícios, André e Jéssica, pelo apoio no início da minha carreira científica.

E a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação e conclusão deste trabalho. Meu muito obrigado!

Tendo acabado de falar, disse a Simão: “Vá para onde as águas são mais profundas”, e a todos: “Lancem as redes para a pesca”.

Simão respondeu: “Mestre, esforçamo-nos a noite inteira e não pegamos nada. Mas, porque és tu quem está dizendo isto, vou lançar as redes”.

Quando o fizeram, pegaram tal quantidade de peixes que as redes começaram a rasgar-se.

Evangelho de Lucas: 5, 4-6 (NVI).

RESUMO

O gênero *Dunaliella* é amplamente estudado, principalmente por suas características extremófilas. A espécie *Dunaliella salina* se destaca como a principal desse gênero, especialmente do ponto de vista comercial, sendo utilizada para a produção do valioso β -caroteno natural. A salinidade influencia diretamente a densidade e a produção de carotenoides da *D. salina*. Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo investigar o efeito da salinidade no crescimento e na produção de pigmentos pela microalga *Dunaliella salina* isolada de uma salina solar do município de Grossos, Rio Grande do Norte, Brasil. O Protocolo Experimental foi realizado em triplicata, contando com três tratamentos nomeados como segue: S12, S22 e S32 com salinidade de 120, 220 e de 320 ppt, respectivamente. A espécie *D. salina* foi cultivada em meio Conway modificado. O crescimento de *D. salina* foi avaliado utilizando-se os parâmetros: Curva de Crescimento, Densidade Celular Máxima (DCM), Taxa Instantânea de Crescimento (r), Duplicações por dia (k), Tempo de Duplicação (T_2) e Produtividade da Biomassa (P). A produção dos pigmentos fotossintéticos pela espécie citada foi obtida a partir das análises das clorofilas a e b e dos carotenoides totais. O teste de Tukey precedido pela ANOVA revelou diferenças significativas entre os tratamentos. A maior DCM foi registrada para o tratamento S12 com $1,21 \times 10^6 \pm 1,30 \times 10^5$ células mL^{-1} , r de $0,36 \text{ dia}^{-1}$, k de $0,46$ divisões dia^{-1} , T_2 de $2,17 \text{ dia}^{-1}$ e P de $1,38 \times 10^5$ células $\text{mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O tratamento S12 também apresentou os melhores resultados, quanto a produção e a maior razão carotenoides: clorofila a ($0,51$). As clorofilas a e b apresentaram valores de $0,94$ e $0,14 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, e os carotenoides totais de $0,48 \text{ mg L}^{-1}$. Foram observados decréscimos nos parâmetros de crescimento e na concentração de pigmentos, na proporção em que a salinidade aumentou. Desse modo, nas condições de cultivo que foram propostas, a salinidade considerada como sendo a melhor para o cultivo da cepa de *D. salina*, isolada de um circuito produtivo de sal do Rio Grande do Norte foi de 120 ppt ($\sim 2 \text{ M}$), apresentando desenvolvimento satisfatório, quando analisados os parâmetros de crescimento e a produção de pigmentos.

Palavras-chave: Salina solar; Microalga; Bioprospecção; Produção de novas cepas; Sustentabilidade.

ABSTRACT

The genus *Dunaliella* is widely studied, mainly for its extremophile characteristics. *Dunaliella salina* stands out as the main species of the genus, especially from a commercial point of view, being used for the production of valuable natural β -carotene. Salinity directly influences the density and carotenoid production of *D. salina*. Thus, the main objective of the present work was to investigate the effect of salinity on the growth and production of pigments by the microalgae *D. salina* isolated from a solar saline in the municipality of Grossos, Rio Grande do Norte, Brazil. The microalgae were grown in modified Conway medium and the experiment was carried out in triplicate, with 3 treatments named as follows: S12, S22 and S32 with salinity 120, 220 and 320 ppt, respectively. Growth was evaluated based on the following parameters: Growth Curve, Maximum Cell Density (MCD), Instantaneous Growth Rate (r), Divisions per day (k), Doubling Time (T_2) and Biomass Productivity (P). The production of photosynthetic pigments was obtained from the analysis of chlorophylls a and b and Total Carotenoids. Tukey's test preceded by ANAVA revealed significant differences between treatments. The highest DCM was recorded for S12 with $1,21 \times 10^6 \pm 1,30 \times 10^5$ cells mL^{-1} , r of $0,36 \text{ day}^{-1}$, k of $0,46$ divisions day^{-1} , T_2 of $2,17 \text{ day}^{-1}$ and P of $1,38 \times 10^5$ cells $\text{mL}^{-1} \text{ day}^{-1}$. S12 also presented the best results regarding production and the highest ratio carotenoid: chlorophyll a (0,51). Chlorophylls a and b had values of $0,94$ and $0,14 \text{ mg L}^{-1}$, respectively, and total carotenoids of $0,48 \text{ mg L}^{-1}$. A decrease in growth parameters and pigment concentration can be observed in the proportion in which salinity increased. Thus, under the cultivation conditions proposed by this research, the best salinity for the cultivation of the *D. salina* strain isolated from a salt production circuit in Rio Grande do Norte is 120 ppt ($\sim 2 \text{ M}$), in which it presented satisfactory development, when the growth parameters and pigment production were analyzed.

Keywords: Solar saltern; Microalgae, Bioprospecting, New strains production; Sustainability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de localização da área de coleta: Grossos, Rio Grande do Norte, Brasil.	21
Figura 2 - A) <i>D. salina</i> cultivada em salinidade de 120 ppt; B) <i>D. salina</i> cultivada em salinidade de 220 ppt (aumento de 400 x). C) <i>D. salina</i> observada ao microscópio óptico em amostra de água recém coletada da salina com salinidade 260 ppt (aumento de 1000x).....	26
Figura 3 - Curva de crescimento da microalga <i>D. salina</i> cultivada em meio a 120 ppt. Os pontos representam a média da densidade celular para cada dia de cultivo. A linha corresponde a tendência da regressão não linear, obtida a partir de equação polinomial de grau 3. **Valor significativo em $p<0,01$	29
Figura 4 - Curva de crescimento da microalga <i>D. salina</i> cultivada em meio a 220 ppt. Os pontos representam a média da densidade celular para cada dia de cultivo. A linha escura corresponde a tendência da regressão não linear, obtida a partir de equação polinomial de grau 3. ** valor significativo em $p<0,01$	29
Figura 5 - Curva de crescimento da microalga <i>D. salina</i> cultivada em meio a 320 ppt. Os pontos representam a média da densidade celular para cada dia de cultivo. A linha escura corresponde a tendência da regressão não linear, obtida a partir de equação logarítmica natural. ** valor significativo em $p<0,01$	30
Figura 6 - Comparação entre as médias de crescimento da microalga nos diferentes tratamentos.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Média dos parâmetros: Taxa Instantânea de Crescimento (r), Divisões por dia (k), Tempo de Duplicação (T_2), Produtividade da Biomassa (P) e Densidade Celular Máxima (DCM) da microalga <i>D. salina</i> , assumindo-se crescimento exponencial e zero mortalidade.....	16
Tabela 2	–	Média da concentração de pigmentos fotossintéticos da microalga <i>D. salina</i> no 14º dia de experimento.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Gás carbônico
DCM	Densidade Celular Máxima
PBR	Fotobiorreator
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
IFCE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
LAQUIPLANC	Laboratório de Aquicultura e Planctologia
Ms.	Mestra
NaCl	Cloreto de Sódio
S12	Tratamento com salinidade 120
S22	Tratamento com salinidade 220
S32	Tratamento com salinidade 320
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

@	Arroba
~	Aproximadamente
β	Beta
Células mL ⁻¹	Células por mililitro
Células mL ⁻¹ dia ⁻¹	Células por mililitro por dia
cm	Centímetro
M	Concentração Molar
©	Copyright
k	Divisões por dia
°C	Graus Celsius
° ' " S W	Graus, minutos e segundos decimais na direção Sul e Oeste
h	Hora
L	Litro
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µg L ⁻¹	Micrograma por litro
µm	Micrometro
mg L ⁻¹	Miligrama por litro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
P	Produtividade
ppt	Partes por mil
‰	Partes por mil
rpm	Rotações por minuto
<i>r</i>	Taxa Instantânea de Crescimento
T ₂	Tempo de Duplicação ou de Geração
x	Vezes
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Área de Estudo	21
3.2	Procedimentos	21
3.3	Delineamento experimental	22
3.3	Crescimento da microalga <i>D. salina</i>	23
3.4	Extração e análise dos pigmentos fotossintéticos	24
3.5	Análise estatística dos dados	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Isolamento e identificação da espécie <i>D. salina</i>	26
4.2	Curva de crescimento e densidade da microalga <i>D. salina</i>	27
4.3	Parâmetros de crescimento e rendimento da produção de pigmentos	31
5	CONCLUSÕES	35
6	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos, fotossintetizantes e consideradas excelentes produtoras de oxigênio (ANDERSEN, 2013). Nos últimos anos, o interesse no cultivo desses organismos tem aumentado, devido as inúmeras aplicações, tais como: alimento natural na aquicultura, na alimentação humana e animal, no desenvolvimento de novos fármacos e cosméticos, na engenharia genética, no tratamento de efluentes industriais, em biorremediação, na produção de biofertilizantes, na mitigação dos gases causadores do efeito estufa, entre outros (RIZWAN *et al.*, 2018).

As principais espécies cultivadas atualmente são: a alga verde de água doce *Chlorella* sp. e a cianobactéria *Arthrospira* sp., ambas utilizadas como alimentos funcionais. A alga verde halofílica *Dunaliella salina* e a alga verde dulcícola *Haematococcus pluvialis*, utilizadas para obtenção dos carotenoides β -caroteno e astaxantina, respectivamente. O dinoflagelado *Cryptothecodinium cohnii* e o thraustochytrides *Schizochytrium* sp., para produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (BOROWITZKA, 2018).

O cultivo comercial desses microrganismos ocorre nos mais variados tipos de sistemas, entre eles, os fotobiorreatores (PBRs), que apresentam diversos formatos, podendo ser abertos ou fechados, tubulares ou em painéis, verticais ou horizontais. A função do PBR é garantir as condições ótimas de cultivo intensivo para a maior quantidade de células possível. As condições ótimas de cultivo estão relacionadas com a faixa adequada de pH e de temperatura, com a disponibilidade de nutrientes e de gás carbônico, com a eliminação do oxigênio excedente, e principalmente, com o maior aproveitamento da luz natural e/ou artificial para maior eficiência fotossintética e menor dano celular (OLAIZOLA; GREWE, 2019).

A espécie *D. salina* se encontra entre as microalgas mais cultivadas no mundo, ocupa a terceira posição no ranking de produção, com 1.700 toneladas ano⁻¹, gerando cerca de 136 milhões de dólares (OLAIZOLA; GREWE, 2019). Os principais produtos obtidos a partir do cultivo é o pó de *Dunaliella* integral, utilizado na ração animal, principalmente para camarões, com o objetivo de pigmentar a musculatura dos animais cultivados. Também os extratos de β -caroteno a 1,5% e a 3% utilizados na indústria de alimentos saudáveis (BOROWITZKA, 2018).

A espécie, *D. salina* é comercialmente cultivada em lagoas abertas na Austrália e em *raceways ponds*, em Israel (BOROWITZKA, 2018). Essa espécie de microalga é considerada a maior fonte natural de β -caroteno, cujas concentrações variam de 4,75 a 14 % do peso seco

(ZHU *et al.*, 2018; BOROWITZKA, 2013). Nesse sentido, o foco da produção de *D. salina* é a obtenção de β -caroteno natural.

Os principais fatores que influenciam a produção e acúmulo do pigmento são a irradiância e a salinidade, respectivamente. A referida microalga se desenvolve na faixa de salinidade que varia de 100 a 350 ppt, tendo o crescimento ótimo em 220 ppt. No entanto, o acúmulo de carotenoides aumenta quando essa espécie de microalga é cultivada em salinidades acima de 300 ppt, embora tenha o crescimento reduzido devido a elevada concentração de sais (BOROWITZKA, 2013).

Para adaptar-se a saturação salina, a espécie *D. salina* apresenta a estratégia de armazenar elevada concentração intracelular de glicerol, a fim de equilibrar a concentração de sais no meio externo. O glicerol possui baixo peso molecular e pode ser armazenado em grandes quantidades na célula, não sendo prejudicial a ação enzimática (BOROWITZKA, 1981).

A saturação salina do meio provoca estresse, que ocasiona a reação metabólica chamada carotenogênese, que é o aumento da produção de carotenoides pela célula a partir do estímulo ambiental. Os pigmentos se acumulam fora do cloroplasto e funcionam como tela protetora do centro de reação fotossintética, evitando excitação demasiada, e agem contra os tripletos de clorofila e as espécies reativas de oxigênio (MASOJIDEK; TORZILLO; KOBLIZEK, 2013).

O β -caroteno natural, obtido principalmente a partir do cultivo de *D. salina*, é formado pela mistura dos isômeros *cis* e *trans*, sendo diferente do β -caroteno sintético, que é constituído quase totalmente (98%) por isômeros *trans* (SINGH; SAMBYAL, 2022). O isômero 9-*cis*- β -caroteno possui propriedades nutricionais e terapêuticas, comprovadas por meio de estudos que evidenciam eficácia no tratamento de distrofias retinóides (inclui a diabetes do tipo 2), obesidade, câncer de mama, cervical, ovariano e colorretal, psoríase em placas e variedade de doenças cardiovasculares (HARVEY; BEN-AMOTZ, 2020).

Além disso, nas últimas décadas com o crescimento da população mundial e a disseminação de conceitos e ações voltadas para a sustentabilidade do planeta, os consumidores estão mais conscientes em relação aos cuidados com a saúde e o meio ambiente. Tal fato tem aumentado a demanda por produtos naturais nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, que passaram a adotar o β -caroteno como matéria prima, contribuindo para fortalecer a importância do cultivo de *D. salina* como fonte natural deste pigmento (POURKARIMI *et al.*, 2020).

Dois dos principais desafios para produção comercial de microalgas são a seleção de cepas que alcancem maior produtividade do composto alvo e a otimização das condições de

crescimento (KSELÍKOVÁ *et al.*, 2022). A bioprospecção de *Dunaliella* a partir de ambientes hipersalinos é apresentada como ótima forma de obtenção de cepas nativas para produção de carotenoides (GALLEGO-CARTAGENA; CASTILLO-RAMÍREZ; MARTÍNEZ-BURGOS, 2019; GUEVARA *et al.*, 2005).

As microalgas nativas, isoladas do meio natural, possuem como vantagem o fato de serem adaptadas ao ambiente e ao clima da região, evitando a introdução de espécies exóticas (GONZALEZ *et al.*, 2020). Além disso, as microalgas apresentam variabilidade intraespecífica elevada, ou seja, cepas isoladas da mesma espécie apresentam diferenças em relação ao crescimento e produção do composto alvo, devido principalmente a plasticidade bioquímica dos diferentes isolados da microalga (GÓMEZ *et al.*, 2016). Dessa forma, o isolamento de cepas nativas é de fundamental importância para o desenvolvimento da biotecnologia de *Dunaliella*.

O estado do Rio Grande do Norte é o maior produtor de sal marinho do Brasil e possui inúmeras salinas solares que ocupam vasta área de seu litoral (COSTA *et al.*, 2013). As salinas solares são ecossistemas biologicamente diversos, que apresentam microrganismos de todos os domínios da vida: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Há riqueza de espécies nesses ambientes que podem ser exploradas de diversas formas. Do ponto de vista biotecnológico, há destaque para a espécie *D. salina*, pela capacidade de acumular grande quantidade de β -caroteno nos cloroplastos. A produção de carotenoides é a maior das aplicações para *Dunaliella* atualmente (MARTÍNEZ; PIRE; MARTÍNEZ-ESPINOSA, 2022).

Portanto, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito da salinidade no crescimento e na produção de pigmentos pela *D. salina*, isolada de uma salina solar do Rio Grande do Norte.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da salinidade no crescimento e na produção de pigmentos pela microalga *D. salina*, isolada de ambiente de salina no semiárido do Rio Grande do Norte.

2.2 Objetivos Específicos

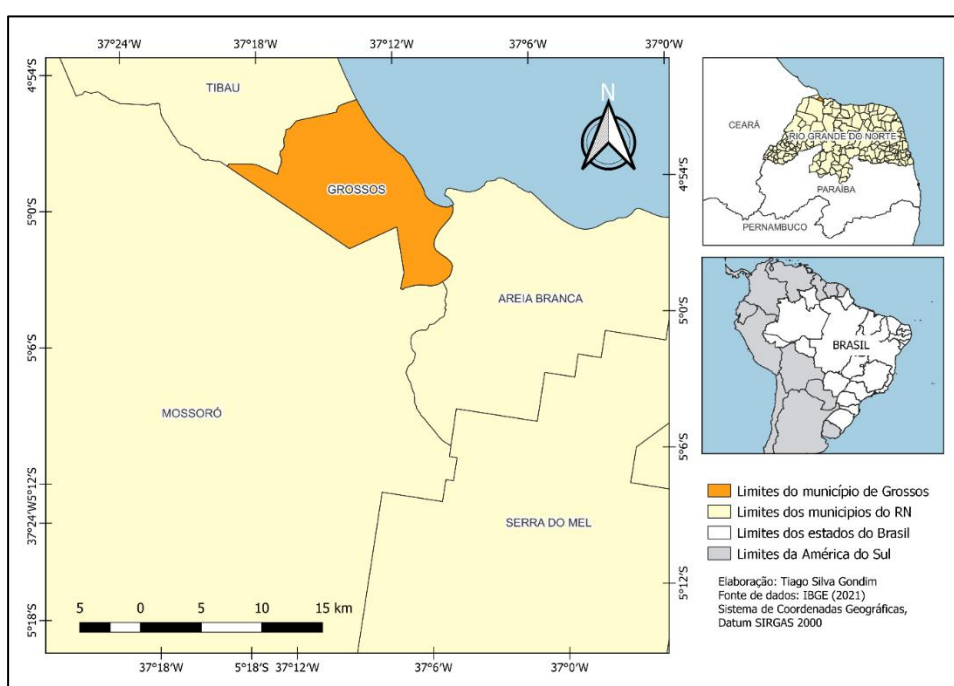
- ✓ Isolar uma cepa clonal da microalga *D. salina*, do ambiente de salina;
- ✓ Investigar os efeitos de diferentes teores de salinidade no crescimento e na produção de pigmentos por essa espécie;
- ✓ Investigar os efeitos de diferentes teores de salinidade na densidade desses organismos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

A área selecionada para a coleta das amostras de água para estudo está localizada na Salina Marisco no município de Grossos-RN, entre as coordenadas 4° 59' 44.684" S, 37° 8' 38.011" W (Figura 1). Esse município possui 708 hectares de área produtiva de sal (COSTA et al., 2013), sendo considerado o terceiro maior produtor salineiro da bacia do rio Apodi-Mossoró, com capacidade produtiva de 441.492 toneladas de sal por safra (LIMA, 2019).

Figura 1 - Mapa de localização da área de coleta: Grossos, Rio Grande do Norte, Brasil.



Fonte: Dados da Pesquisa – Mapa elaborado no software QGIS.

3.2 Procedimentos

A coleta foi realizada durante o mês de setembro de 2022. As amostras de água foram retiradas diretamente dos cristalizadores da Salina Marisco e cedidas para fins de pesquisa pelo Prof. Rogério Taygra Vasconcelos Fernandes. As amostras de água tinham salinidade de 260 ppt e foram armazenadas em tubos cônicos de 50 mL. Em seguida, foram transportadas para o Laboratório de Aquicultura e Planctologia (LAQUIPLANC) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), para realização da identificação e isolamento da espécie de microalga a ser estudada.

A identificação foi realizada utilizando-se a preparação de lâminas que foram observadas, por meio de um microscópio binocular. Foi constatada a ocorrência da referida espécie de microalga, através da presença de células avermelhadas, ovóides e flageladas característica típica das espécies halofílicas do gênero *Dunaliella*. A identificação taxonômica da espécie em estudo foi confirmada por meio de consultas à Literaturas Especializadas de Throndsen (1997) e Borowitzka e Siva (2007).

As amostras de água foram enriquecidas com Meio Conway e deixadas ao sol pelo período de 3 dias, visando estimular o crescimento da espécie de microalga identificada e facilitar o processo de isolamento, que foi realizado em meio sólido, sendo constituído de Meio Conway a 2 M NaCl e ágar na concentração de 0,8% (LOURENÇO, 2006). Basicamente, uma gota da amostra natural foi colocada em ponto periférico da placa de Petri e espalhada com auxílio de uma alça microbiológica. As placas ficaram pelo período de oito dias em uma estrutura com três lâmpadas fluorescentes de 40 W para que houvesse oferta de luz constante.

Após esse período, houve o crescimento de colônias de cor verde. Para prosseguir com o isolamento das células da microalga, foram selecionadas cinco colônias, que estivessem localizadas em áreas mais isoladas das diferentes placas de Petri. Pequenas amostras das cinco colônias de microalga foram recolhidas com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro e levadas ao microscópio, para confirmação da presença da microalga identificada.

Após a confirmação da espécie, *D. salina*, as colônias foram transferidas para o meio líquido em cinco diferentes erlenmeyers de 125 mL, contendo 60 mL de Meio Conway a 2 M NaCl, onde as cepas de microalga cresceram por cerca de uma semana. Passado esse período, utilizou-se o método de centrifugação e lavagem para purificação das cepas de *D. salina* isoladas, conforme descrito por Sipaúba-Tavares e Rocha (2003).

3.3 Delineamento experimental

Na etapa que antecedeu a purificação das cepas, notou-se que a cepa 01 apresentou um crescimento excelente. Consequentemente esta cepa foi escolhida para a realização do experimento e o inóculo foi obtido a partir dela. O cultivo da microalga *D. salina* foi realizado em 9 erlenmeyers de 500 mL, contendo 270 mL do Meio Conway e 30 mL do inóculo. O experimento teve um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e foi conduzido em triplicatas com três tratamentos:

- ✓ S12: Meio Conway a 120 ppt;
- ✓ S22: Meio Conway a 220 ppt;

✓ S32: Meio Conway a 320 ppt;

Os frascos foram mantidos por 14 dias em uma temperatura de 26 °C (±0,5) e em pH inicial de 7,5, recebendo agitação manual três vezes ao dia, para evitar a decantação e a impregnação das células nas paredes dos frascos. A iluminação foi fornecida a partir de lâmpadas de 40 W do tipo Luz do Dia. Não houve fotoperíodo.

3.3 Crescimento da microalga *D. salina*

Para construção da curva de crescimento de *D. salina*, utilizou-se a Câmara de Contagem de Neubauer, com leitura diária e média de duas contagens (LOURENÇO, 2006). Os parâmetros de crescimento foram calculados, incluindo: Densidade Celular Máxima (DCM), observada quando a cultura atingiu a maior densidade celular. A Taxa Instantânea de Crescimento (r), Duplicações por dia (k), Tempo de Duplicação (T_2) e Produtividade da Biomassa (P) foram calculados com base nas equações utilizadas pelos autores (WOOD; EVERROAD; WINGARD, 2005) como segue:

Equação 1:

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t}$$

Onde,

r = Taxa Instantânea de Crescimento;

$\ln N_t$ = Logaritmo natural do tamanho da população de *D. salina*, no final do intervalo de tempo;

$\ln N_0$ = Logaritmo natural do tamanho da população de *D. salina*, no início do intervalo de tempo;

Δt = Intervalo de tempo decorrido entre as medidas de números de células ($t_t - t_0$).

Equação 2:

$$k = \frac{\log_2 (N_t/N_0)}{\Delta t}$$

Onde,

k = Divisões por dia;

N_t = Tamanho da população de *D. salina*, no final do intervalo de tempo;

N_0 = Tamanho da população de *D. salina*, no início do intervalo de tempo;

Δt = Intervalo de tempo decorrido entre as medidas do tamanho da população ($t_t - t_0$).

Equação 3:

$$T_2 = 0,6931/r$$

Onde,

T_2 = Tempo de Duplicação ou de Geração;

r = Divisões por dia obtido na equação 1.

Equação 4:

$$P = \frac{(N_t - N_0)}{\Delta t}$$

Onde,

P = Produtividade da Biomassa em células $\text{mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$;

N_t = Tamanho da população de *D. salina*, no final do intervalo de tempo;

N_0 = Tamanho da população de *D. salina*, no início do intervalo de tempo;

Δt = Intervalo de tempo decorrido entre as medidas do tamanho da população ($t_t - t_0$).

3.4 Extração e análise dos pigmentos fotossintéticos

Para a extração das clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais, as amostras dos 9 frascos foram filtradas, com filtros de microfibra de vidro (GF-F) 0,7 μm de porosidade. Em seguida, os filtros foram macerados em grau com pistilo imersos em 5 mL de acetona a 90%. Posteriormente, o material foi deixado sob refrigeração durante 18 h a 4°C. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos (PARANHOS, 1996). As leituras das absorbâncias dos pigmentos fotossintéticos foram realizadas em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 750, 665, 664, 647, 630, 510 e 480 nm. As equações utilizadas para o cálculo das concentrações das clorofilas *a* e *b* foram aquelas sugeridas por Jeffrey e Humphrey (1975), e para os carotenoides totais aquelas indicadas por Strickland e Parsons (1968).

Equação 5: Cálculo da Clorofila *a*

$$[\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g L}^{-1})] = \frac{(11,85 \cdot A - 1,54 \cdot B - 0,08 \cdot C) \cdot v}{V \cdot c}$$

Equação 6: Cálculo da Clorofila *b*

$$[\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g L}^{-1})] = \frac{(21,03 \cdot B - 5,43 \cdot A - 2,66 \cdot C) \cdot v}{V \cdot c}$$

Equação 7: Cálculo dos Carotenoides Totais

$$[\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g L}^{-1})] = \frac{[7,6 \cdot A_{480} - (3,0 \cdot A_{750}) - 1,49 \cdot A_{510} - (2,0 \cdot A_{750})] \cdot v}{V \cdot c}$$

Onde,

v = Volume da acetona usada para extração dos pigmentos (L);

V = Volume filtrado da cultura (L);

c = Caminho óptico da cubeta (cm);

$A = 664 - (bt + bf)$, absorvância em 664 nm menos a soma do branco da turbidez e do filtro;

$B = 647 - (bt + bf)$, absorvância em 647 nm menos a soma do branco da turbidez e do filtro;

$C = 630 - (bt + bf)$, absorvância em 630 nm menos a soma do branco da turbidez e do filtro;

A_{480} = leitura da absorvância em 480 nm;

A_{750} = leitura da absorvância em 750 nm;

A_{510} = leitura da absorvância em 510 nm.

3.5 Análise estatística dos dados

Foi realizada a análise de variância univariada, com delineamento inteiramente casualizado para avaliar os teores de pigmentos e os parâmetros de crescimento, uma vez que os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram satisfeitos.

Foram comparadas as médias entre os tratamentos utilizando-se o teste de Tukey a 5%. O software usado foi o SAS (SAS INSTITUTE, 2015). As figuras que mostraram a curva de crescimento foram elaboradas usando o software Table Curve 2D (SYSTAT SOFTWARE INC, 2014) e as equações de regressão não linear foram escolhidas, quando os parâmetros e o R^2 foram significativos ($p < 0,01$).

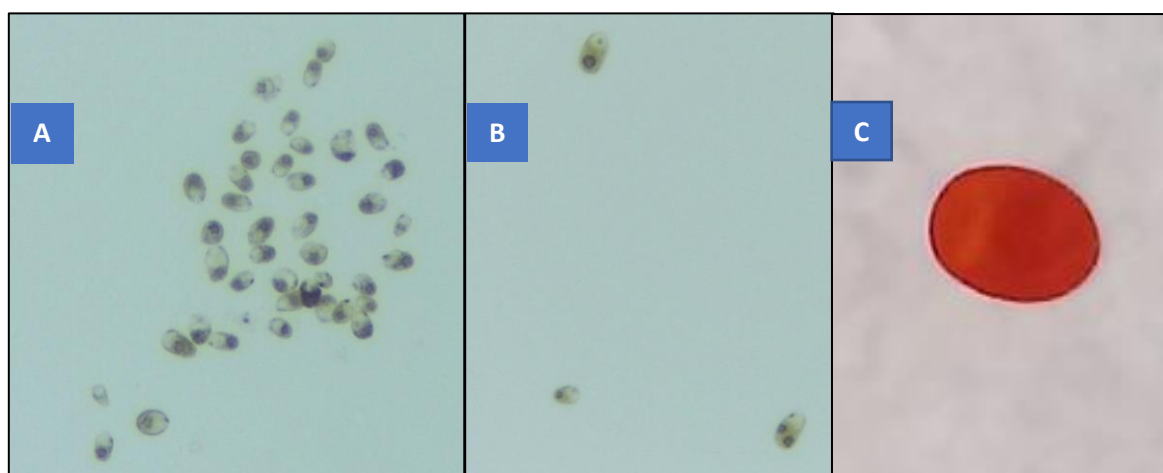
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação da espécie *D. salina*.

Com o desenvolvimento deste estudo, a partir do isolamento em ágar obteve-se um total de 5 cepas de *D. salina*, que foram nomeadas como segue: C01, C02, C03, C04 e C05. A cepa C01 foi selecionada para o experimento, por ter apresentado um excelente crescimento, quando colocada em meio líquido.

Neste estudo a confirmação da espécie do gênero *Dunaliella* foi obtida, a partir da caracterização morfológica das células observadas, com base em metodologia sugerida por Borowitzka e Siva (2007), relativa à Taxonomia indicada para o gênero *Dunaliella*. Dentre os caracteres morfológicos apresentados foram observadas células verdes e avermelhadas, com cloroplasto em formato de taça; pirenoide grande, basal e axial, rodeado por gotículas de amido; presença de dois flagelos; e, apenas um estigma presente (Figura 2).

Figura 2 - A) *D. salina* cultivada em salinidade de 120 ppt; **B)** *D. salina* cultivada em salinidade de 220 ppt (aumento de 400 x). **C)** *D. salina* observada ao microscópio óptico em amostra de água recém coletada da salina com salinidade 260 ppt (aumento de 1000x).



Fonte: Dados da Pesquisa.

Tais características morfológicas foram semelhantes àsquelas relatadas por Achour et al. (2019) e por Arun e Singh (2013), os quais também obtiveram cepas da microalga, *D. salina* isoladas a partir de ambientes hipersalinos. Em sequência, Barclay e Apt (2013), chamaram a atenção para a bioprospecção de microalgas extremófilas a partir de ambientes hipersalinos e suas aplicações nos cultivos comerciais ao ar livre, com o objetivo de manter a monocultura e prevenir a invasão por organismos zooplanctônicos.

Para este estudo, foi necessário manter o meio de cultura com salinidade acima de 2 M e a cepa isolada e cultivada atendeu aos requisitos de resistência ao sal, demonstrando um considerável potencial para o crescimento em meios de cultura hipersalinos, com bom desenvolvimento, em concentrações que variaram de 120 a 320 ppt.

4.2 Curva de crescimento e densidade da microalga *D. salina*.

Com referência à densidade, os resultados mostraram que o tratamento S12 foi o que apresentou a maior densidade celular, atingindo a Densidade Celular Máxima (DCM) no 13º dia de cultivo, com $1,21 \times 10^6 \pm 1,30 \times 10^5$ células mL⁻¹. Em se tratando do tratamento S22 a DCM ocorreu no 12º dia de cultivo, com $5,19 \times 10^5 \pm 6,60 \times 10^4$ células mL⁻¹ e com relação ao tratamento S32 a DCM foi de $2,57 \times 10^5 \pm 4,41 \times 10^4$ células mL⁻¹ no 11º dia do cultivo experimental. Os resultados do teste de Tukey revelaram diferença significativa entre as médias da DCM dos três tratamentos (Tabela 1).

Em relação a fase de adaptação, o tempo de duração foi o mesmo entre os tratamentos, exceto em S32, onde se observou uma leve mortalidade no 2º dia, porém, com rápida recuperação já no 3º dia de cultivo. A transferência do inóculo com salinidade correspondente a 120 ppt para o frasco de cultivo, contendo meio de cultura com 320 ppt pode ter ocasionado problemas relacionados à osmorregulação celular, resultando em choque osmótico com declínio da densidade algal. Os autores Coesel et al. (2008), estudaram os efeitos do choque osmótico no crescimento e na produção de carotenoides pela microalga, *D. salina*, e verificaram que nas mudanças de salinidade de 90 para 270 ppt, ocorreu um decréscimo no número de células, durante a fase de adaptação corroborando os resultados acima apresentados.

No que diz respeito à fase exponencial de crescimento das microalgas, foram observadas diferenças em relação a duração desta fase entre os tratamentos. Em S12, a fase exponencial se desenvolveu entre o 2º e 9º dia de cultivo, enquanto em S22 seu desenvolvimento ocorreu entre o 2º e 12º dia de cultivo e já em S32 o desenvolvimento da fase exponencial se deu entre o 3º e 11º dia de cultivo. Há relatos de duração semelhante para a fase exponencial da microalga, *D. salina* cultivada em meio Conway a 35 ppt, em estudos realizados por Colusse et al. (2020), onde a referida fase durou do 2º ao 10º dia de cultivo.

No presente estudo, também foram observadas diferenças em relação ao início da fase estacionária. No tratamento S12, essa fase se iniciou no 10º dia de cultivo, em S22, a referida fase teve início no 13º dia de cultivo e por fim em S32 a fase estacionária foi iniciada no 12º dia de cultivo. Considerando os resultados de estudos realizados por Barros et al. (2015) a fase de cultivo interfere diretamente na eficiência da colheita da biomassa algal. Como justificativa para tal afirmativa os pesquisadores Besson e Guiraud (2013) já haviam descrito que a fase estacionária é a mais adequada para realização da colheita de biomassa, através do método de floculação/flotação. Durante essa fase as microalgas apresentam atividade metabólica,

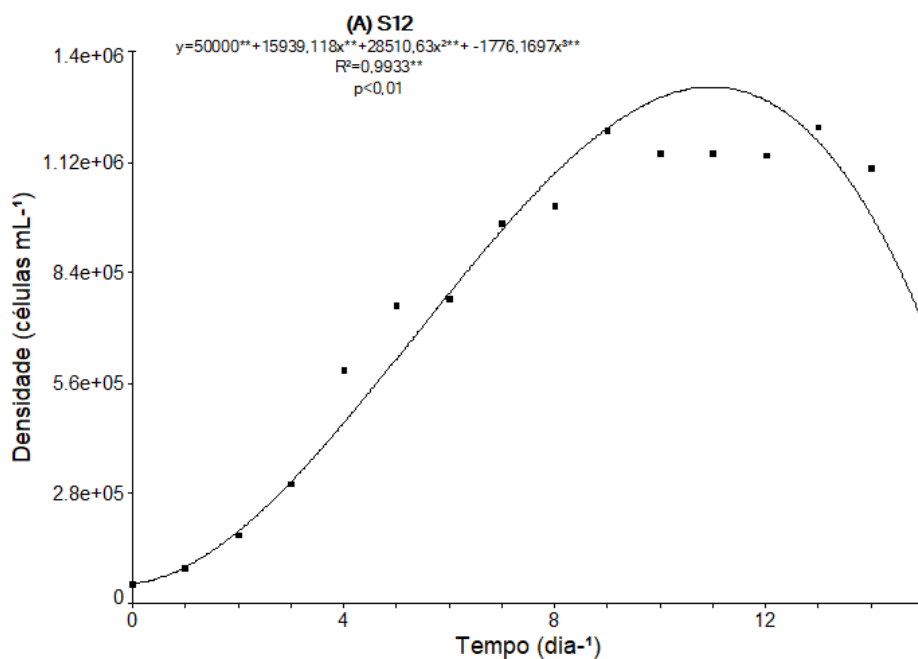
motilidade e potencial zeta reduzidos, além de maior tamanho das partículas, devido a formação de aglomerados celulares, como foi sugerido pelos autores Singh e Patidar (2018).

Neste estudo, o efeito da salinidade foi claro em relação a densidade populacional de *D. salina*, que demonstrou decréscimo no número de células, quando os teores de sal tiveram seus valores aumentados. De acordo com os dados resultantes da revisão realizada por Pourkarimi et al. (2020), a salinidade interfere diretamente no cultivo de microalgas, especialmente na quantidade de biomassa e na produção do composto alvo.

A cepa de *D. salina* pesquisada neste estudo, demonstrou ser capaz de se desenvolver em salinidade de até 320 ppt, apresentando uma densidade semelhante à descrita por Kim et al. (2022) e superior àquela relatada por Mishra; Mandoli; Jha (2008), que cultivaram a microalga, *D. salina* em salinidades que variaram de 35 a 321 ppt. Comparativamente, os pesquisadores Pisal e Lele (2005) realizaram um experimento parecido, desenvolvido em meio hipersalino (88 a 270 ppt). Porém, a estirpe utilizada não suportou a concentração de 270 ppt, atingindo a fase de morte no 3º dia do experimento. Esses resultados reiteram o fato de que quando se considera a plasticidade bioquímica, cepas de diferentes regiões geográficas adaptam-se de modo único as mudanças na salinidade, como foi discutido por García; Freile-Pelegrín; Robledo (2007).

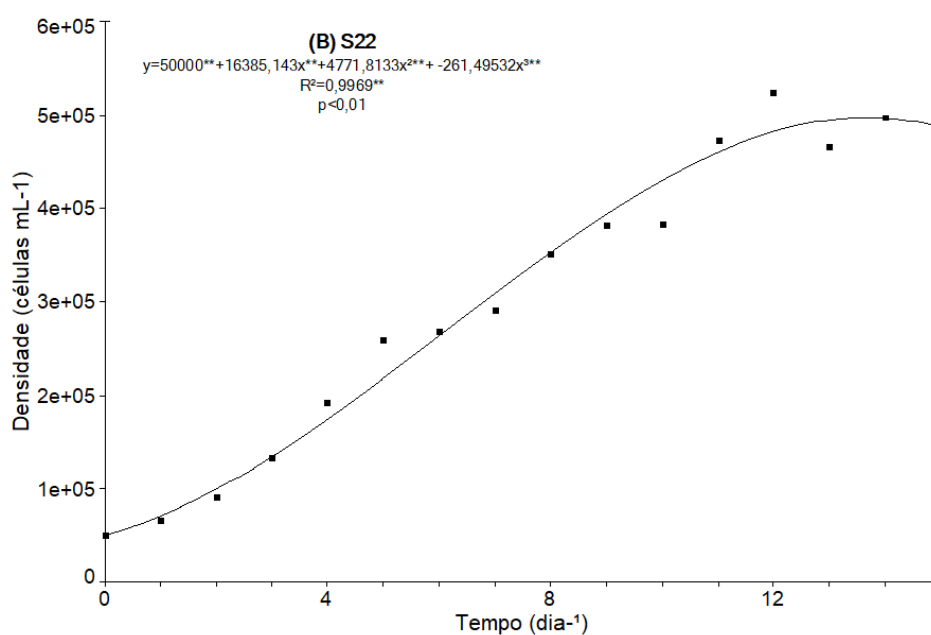
Nas figuras 3, 4 e 5 se encontram representadas as curvas de crescimento em diferentes salinidades e as equações de regressão não linear, que foram utilizadas para estimar o crescimento da microalga, *D. salina*. A equação polinomial de 3º grau $y=50000+15939,118x+28510,63x^2+(-1776,1697x^3)$ ($R^2=0,9933$), descreve o crescimento da microalga, *D. salina* cultivada em salinidade 120 ppt. Do mesmo modo, a equação $y=50000+16385,143x+4771,8133x^2+(-261,49532x^3)$ ($R^2=0,9969$) representa o crescimento da microalga, *D. salina* cultivada em 220 ppt. E finalmente, a equação logarítmica natural $\ln y=10,819778+0,21479222+(-0,0067917418x^2)$ ($R^2=0,9512$) o crescimento da microalga, *D. salina* para o teor de salinidade 320 ppt. Os elevados valores de R^2 desses modelos, indicam que eles tiveram um ajuste ideal para os dados de densidade no tempo (nº de células x dias de cultivo) da microalga, *D. salina*. Também é possível fazer um comparativo entre as diferenças no crescimento dos três tratamentos a partir da figura 6.

Figura 3 - Curva de crescimento da microalga *D. salina* cultivada em meio a 120 ppt. Os pontos representam a média da densidade celular para cada dia de cultivo. A linha corresponde a tendência da regressão não linear, obtida a partir de equação polinomial de grau 3. **Valor significativo em $p < 0,01$



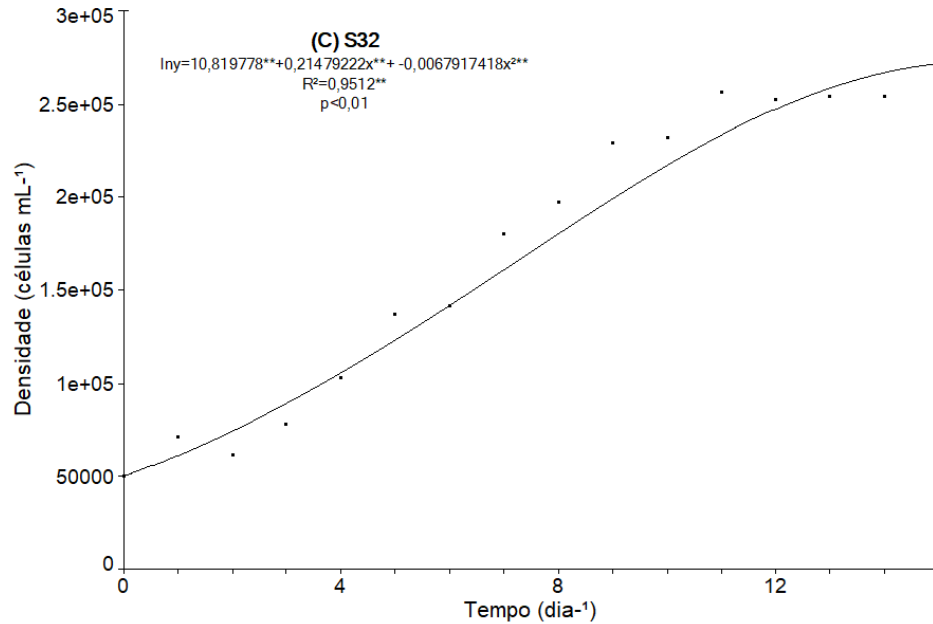
Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 4 - Curva de crescimento da microalga *D. salina* cultivada em meio a 220 ppt. Os pontos representam a média da densidade celular para cada dia de cultivo. A linha escura corresponde a tendência da regressão não linear, obtida a partir de equação polinomial de grau 3. ** valor significativo em $p < 0,01$



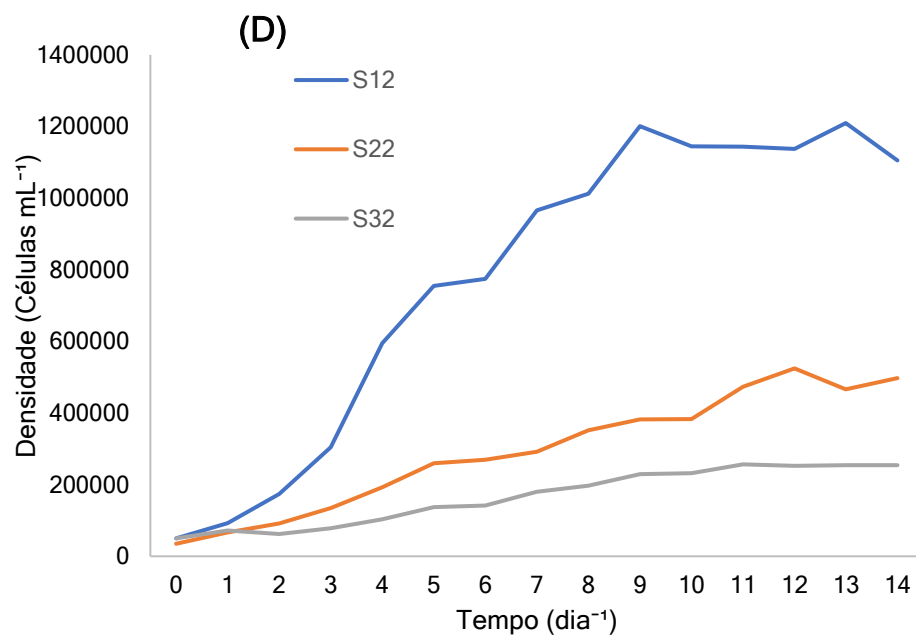
Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 5 - Curva de crescimento da microalga *D. salina* cultivada em meio a 320 ppt. Os pontos representam a média da densidade celular para cada dia de cultivo. A linha escura corresponde a tendência da regressão não linear, obtida a partir de equação logarítmica natural. ** valor significativo em $p < 0,01$



Fonte: Dados da Pesquisa

Figura 6 - Comparação entre as médias de crescimento da microalga nos diferentes tratamentos.



Fonte: Dados da Pesquisa

4.3 Parâmetros de crescimento e rendimento da produção de pigmentos

Durante o tratamento estatístico dos dados, os resultados obtidos com o emprego do teste de Tukey mostraram diferenças significativas entre o desempenho no crescimento da *D. salina*, cultivada separadamente em meios com as três diferentes salinidades (Tabela 1). Com relação ao Tempo de Duplicação (T_2), o teste de Tukey mostrou diferenças estatísticas entre as médias dos três tratamentos, sendo 2,17 dia⁻¹ para o tratamento S12; 3,73 dia⁻¹ para o tratamento S22 e 4,49 dia⁻¹ para o tratamento S32. Os resultados permitiram a observação de que o T_2 aumentou conforme o incremento da salinidade. Nesse caso, foram necessários aproximadamente dois dias para que no tratamento S12 se observasse uma duplicação da densidade celular. Por outro lado, no tratamento S32, foi preciso cerca de 4,5 dias (o dobro do tempo do tratamento S12) para que ocorresse uma única duplicação populacional. O Tempo de Duplicação indica a quantidade de dias necessários para que a microalga duplique sua população. Os pesquisadores Ahmadabad et al. (2021), ao estudarem a influência de diferentes estressores, incluindo a salinidade (que variou de 29 a 233 ppt), no crescimento de *D. salina*, verificaram que, embora a salinidade não tenha efeito inibitório no desenvolvimento da microalga, esse parâmetro pode acarretar retardamento no crescimento, indicado pelo Tempo de Duplicação, que se torna mais longo conforme aumento da concentração de sais (1,5 e 19 dia⁻¹ para as salinidades 87 e 233 ppt, respectivamente).

Neste estudo, o teste de Tukey realizado com os dados obtidos também permitiu detectar que entre os tratamentos S22 e S32 não houve diferenças significativas para o aumento de salinidade, em relação aos parâmetros r , k e P . O maior crescimento alcançado pela *D. salina* foi na condição de cultivo com salinidade 120 ppt, na qual apresentou uma Taxa Instantânea de Crescimento (r) de 0,36 dia⁻¹, k de 0,46 divisões dia⁻¹ e Produtividade da Biomassa (P) de $1,38 \times 10^5$ células mL⁻¹ dia⁻¹. Na salinidade de 220 ppt a espécie *D. salina* se desenvolveu com uma taxa r de 0,19 dia⁻¹, k de 0,27 divisões dia⁻¹ e Produtividade da Biomassa (P) de $4,11 \times 10^4$ células mL⁻¹ dia⁻¹. Na cultura realizada em salinidade de 320 ppt, a microalga, *D. salina* apresentou taxas de crescimento menores, comparadas aos demais tratamentos, com (r) de 0,15 dia⁻¹, k de 0,22 divisões dia⁻¹ e P de $2,15 \times 10^4$ células mL⁻¹ dia⁻¹.

As taxas instantâneas de crescimento e as de divisões por dia apresentaram decréscimo, à medida que os teores de sal aumentaram. Esses resultados foram corroborados pelos autores García; Freile-Pelegrín; Robledo (2007) e também pelos pesquisadores Arun e Singh (2013), que cultivaram a microalga, *D. salina* em salinidades que variaram de 60 a 350 ppt e encontraram taxas específicas de crescimento que apresentaram valores de 0,1 a 0,3 dia⁻¹.

Em se tratando dos resultados relativos à produção de pigmentos e aos parâmetros de crescimento obtidos neste estudo, a microalga *D. salina* cultivada em meio com salinidade de 120 ppt apresentou o melhor desempenho dentre os três tratamentos. Essa concentração de sais é aproximada de 2 M (~116 ppt), que é a concentração de sais ideal para o bom desenvolvimento da microalga, conforme apontado na literatura científica (VO; TRAN, 2014, MISHRA; MANDOLI; JHA, 2008, CHEN; JIANG; WU, 2009).

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram as menores taxas de crescimento de *D. salina* nas salinidades de 220 e de 320 ppt. Destaca-se que, o experimento não contou com aeração, que não é essencial, dado o pequeno volume utilizado, mas que beneficiaria o crescimento da alga, tendo em vista o percentual de 0,03% de CO₂ presente no ar atmosférico, como descrito por Lourenço (2006).

Sabe-se que o fluxo de carbono tem grande importância na manutenção de *D. salina* em ambientes hipersalinos, pois desempenha papel fundamental na produção do glicerol, principal carboidrato responsável pelo equilíbrio osmótico da célula. A anidrase carbônica é a principal enzima envolvida no processo de aquisição de íons CO₂ e não é inativada diante do ambiente hipertônico, como afirmado por Pick (2002).

O carbono inorgânico tende a ser menos solúvel em águas saturadas de NaCl, estando menos disponível para a ser metabolizado, como sugerido por Borowitzka (2013). Isso pode explicar as menores taxas de crescimento nas salinidades 220 e 320 ppt.

Tabela 1. Média dos parâmetros de crescimento: Taxa Instantânea de Crescimento (*r*), Divisões por dia (*k*), Tempo de Duplicação (*T*₂), Produtividade da Biomassa (*P*) e Densidade Celular Máxima (DCM) da microalga *D. salina*, considerando crescimento exponencial e mortalidade zero.

Níveis de salinidade (‰)	Parâmetros de crescimento				
	<i>r</i> <i>r</i> dia ⁻¹	<i>k</i> divisões dia ⁻¹	<i>T</i> ₂ dia ⁻¹	<i>P</i> Céls. mL ⁻¹ dia ⁻¹	DCM Céls. mL ⁻¹
120	0,32 a*	0,46 a	2,17 a	1,38×10 ⁵ a	1,21×10 ⁶ a
220	0,19 b	0,27 b	3,73 b	4,11×10 ⁴ b	5,19×10 ⁵ b
320	0,15 b	0,22 b	4,49 c	2,15×10 ⁴ b	2,57×10 ⁵ c
Cv (%)	5,87	6,03	6,61	17,92	13,29

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise estatística das médias revelou diferenças significativas para o rendimento de pigmentos fotossintéticos produzidos pela *D. salina* submetida às concentrações de sais

utilizadas, de modo experimental neste trabalho (Tabela 2). A quantidade de clorofilas *a* e *b* diminuiu, em função do aumento de salinidade e somente o resultado do tratamento S32 diferiu dos demais tratamentos, de acordo com o teste de médias de Tukey, apresentando os menores valores entre os tratamentos, que foram de 0,49 e de 0,09 mg L⁻¹ para as clorofilas *a* e *b*, respectivamente. Em relação aos carotenoides totais, os resultados mostraram a ocorrência de uma redução na sua concentração em decorrência da elevação do teor de sal. Foram observadas diferenças significativas entre os resultados dos tratamentos S12, S22 e S32, em que apresentaram valores de carotenoides totais de 0,48, 0,35 e 0,22 mg L⁻¹, respectivamente. Em se tratando da razão carotenoides: clorofila *a*, foi observada sua redução em função incremento da salinidade, com diferenças significativas entre os tratamentos S12 e S32, sendo 0,51 e 0,44, respectivamente. Com referência ao tratamento S12 foram registrados os maiores valores para a concentração de pigmentos e para a razão carotenoides: clorofila *a*. As clorofilas *a* e *b* apresentaram valores de 0,94 e 0,14 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 2. Média da concentração de pigmentos fotossintéticos da microalga *D. salina* no 14º dia da fase experimental do trabalho.

Níveis de salinidade (‰)	Características			
	Clorofila <i>a</i> mg L ⁻¹	Clorofila <i>b</i> mg L ⁻¹	Carotenoides Totais - mg L ⁻¹	Razão Carotenoides: Clorofila <i>a</i>
120	0,94 a*	0,14 a	0,48 a	0,51 a
220	0,76 a	0,13ab	0,35 b	0,46 ab
320	0,49 b	0,09 b	0,22 c	0,44 b
Cv (%)	12,65	14,13	13,44	5,02

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os pigmentos fotossintéticos apresentaram valores inferiores em relação aos descritos para uma outra cepa do Brasil isolada por Fernandes; Gonçalves; Arruda (2022), com valores de clorofila *a* de 60,60 e 40,93 mg L⁻¹ e carotenoides totais de 28,34 e 34,73 mg L⁻¹, para as salinidades 100 e 260 ppt, nesta ordem. No entanto, a razão carotenoides totais:clorofila *a*, teve resultado semelhante, de 0,48 e 0,85 para as salinidades 100 e 260 ppt, respectivamente. Os autores Arun e Singh (2013) identificaram uma razão superior, com valores de 1 a 4 para *D. salina*, cultivada em salinidades que variaram de 60 a 300 ppt.

Ao estudarem o efeito de condições estressantes, tais como alta luminosidade, alta salinidade e deficiência de nutrientes, Wu et al. (2020), verificaram que a alta salinidade não induziu a produção de β-caroteno para a cepa da microalga, *D. salina* empregada no estudo.

Além disso, Coesel et al. (2008) relataram que, de forma isolada, a salinidade não foi suficiente para promover a carotenogênese da *D. salina*. Os autores destacam que outros fatores como, a luminosidade e a deficiência de nutrientes deveriam ser combinadas a salinidade, para que se obtivesse um maior rendimento de pigmentos fotossintéticos.

5 CONCLUSÕES

Para as condições experimentais descritas neste estudo pode-se concluir que:

- ✓ Como o primeiro objetivo do estudo é propor o isolamento da microalga, *Dunaliella salina* do seu ambiente natural, está claro que a inoculação em placas de Petri permite o isolamento da cepa de interesse e contribui significativamente para o desenvolvimento populacional das cepas facilitando a seleção entre elas;
- ✓ A cepa C01 é resistente à salinidade elevada e apresenta crescimento semelhante ou superior quando comparada à outras cepas cultivadas em condições hipersalinas;
- ✓ O isolamento pode ser considerado eficiente, facilitando a identificação do Gênero *Dunaliella* e da espécie *D. salina* investigada ao longo do estudo;
- ✓ A densidade celular é afetada pela salinidade e diminui conforme o aumento da concentração de sais;
- ✓ As taxas de crescimento são afetadas pela salinidade e diminuem proporcionalmente com o aumento da concentração de sais;
- ✓ A condição de cultivo com salinidade equivalente aos 120 ppt é a ideal para o crescimento e a produção de pigmentos pela *D. salina*, avaliados com este estudo;
- ✓ Não há expressividade em relação ao teor de carotenoides produzido pela *D. salina*.
- ✓ Sugere-se que em experimentos futuros sejam implantadas novas análises para testar outros ocasionadores de estresse, como a luminosidade, a temperatura e a depleção de nutrientes, em condição de salinidade equivalente a 120 ppt com o intuito de estimular a carotenogênese e descobrir o potencial de produção do β -caroteno;
- ✓ Sugere-se também que sejam investigados outros pigmentos de valor comercial, e demais biomoléculas, que a cepa C01 tenha potencial para produzir.

6 REFERÊNCIAS

- ACHOUR, H. Y. et al. Isolation, Molecular Identification and the Carotenogenesis Process of the Microalgae *Dunaliella salina* Strain DunaDZ1 Isolated from an Algerian Salt Lake. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n. 5, 2019.
- ANDERSEN, Robert A. The microalgal cell. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2013, p. 3-19.
- AHMADABAD, Y. H. et al. Effect of different salinity, temperature and pH levels on the growth of *Dunaliella salina* algae isolated from Lake Urmia. **Journal of Fisheries**, v. 74, n. 4, p. 557–573, 22 dez. 2021.
- ARUN, N.; SINGH, D. P. Differential response of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* isolated from brines of Sambhar Salt Lake of Rajasthan (India) to salinities: A study on growth, pigment and glycerol synthesis. **Journal of the Marine Biological Association of India**, v. 55, n. 1, p. 65–70, 15 jun. 2013.
- BARCLAY, William; APT, Kirk. Strategies for Bioprospecting Microalgae for Potential Commercial Applications. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2013, p. 80-89.
- BARROS, A. I. et al. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1489–1500, 1 jan. 2015.
- BESSON, A.; GUIRAUD, P. High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 464–470, 1 nov. 2013.
- BOROWITZKA, L. J. The microflora: Adaptations to life in extremely saline lakes. In: WILLIAMS, W.D. (ed.). **Salt Lakes: Developments in Hydrobiology**. v. 5, Springer, Dordrecht, 1981, p. 34-46 DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-8665-7_4.
- BOROWITZKA, M. A. *Dunaliella*: Biology, Production, and Markets. In: Richmond, A.; Hu, Q. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2013. p. 359-368
- BOROWITZKA, M. A.; SIVA, C. J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 5, p. 567–590, 1 out. 2007.
- BOROWITZKA, M. Commercial-Scale Production of Microalgae for Bioproducts. In: LA BARRE, S.; S. BATES, S. (Eds.). **Blue Biotechnology**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018. p. 33–65.
- CHEN, H.; JIANG, J.-G.; WU, G.-H. Effects of Salinity Changes on the Growth of *Dunaliella salina* and Its Isozyme Activities of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6178–6182, 22 jul. 2009.

COESEL, S. N. et al. Nutrient Limitation is the Main Regulatory Factor for Carotenoid Accumulation and for Psy and Pds Steady State Transcript Levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) Exposed to High Light and Salt Stress. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 602–611, 1 set. 2008.

COLUSSE, G. A. et al. Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00508, 1 set. 2020.

COSTA, DF DA S. et al. Breve revisão sobre a evolução histórica da atividade salineira no estado do Rio Grande do Norte (Brasil). **Sociedade & Natureza**, v. 25, n. 1, pág. 21-34, abr. 2013.

FERNANDES, R. T. V.; GONÇALVES, A. A.; ARRUDA, A. M. V. D. Growth, bioactive compounds and chemical composition of marine microalga *Dunaliella salina* in batch cultures. **Revista Agraria Academica**, v. 5, n. 1, p. 77–88, 1 jan. 2022.

GALLEGO-CARTAGENA, E.; CASTILLO-RAMÍREZ, M.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. Effect of stressful conditions on the carotenogenic activity of a Colombian strain of *Dunaliella salina*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1325–1330, nov. 2019.

GARCÍA, F.; FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1359–1365, maio 2007.

GÓMEZ, P. I. et al. Intraspecific variability among Chilean strains of the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta): an opportunity for its genetic improvement by simple selection. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 4, p. 2115–2122, 1 ago. 2016.

GONZALEZ, E. G. et al. Bioprospection of green microalgae native to Paraná, Brazil using a multi-criteria analysis: Potential for the production of lipids, proteins, and carotenoids. **Bioresource Technology Reports**, v. 10, p. 100398, jun. 2020.

GUEVARA, M. et al. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 53, n. 3–4, p. 331, setembro 2005.

HARVEY, P. J.; BEN-AMOTZ, A. Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9-cis β -carotene production. **Algal Research**, v. 50, p. 102002, set. 2020.

JEFFREY, S.W; HUMPHREY, G.F. New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c and c₂ in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167, 1975, p. 191-194.

KIM, M. et al. Identification and characterization of *Dunaliella salina* OH214 strain newly isolated from a saltpan in Korea. **Algae**, v. 37, n. 4, p. 317–329, 15 dez. 2022.

KSELÍKOVÁ, V. *et al.* Improving microalgae for biotechnology — From genetics to synthetic biology – Moving forward but not there yet. **Biotechnology Advances**, v. 58, p. 107885, 1 set. 2022.

LIMA, V. K. P. DE. **Mapeamento de áreas produtoras de sal do Rio Grande do Norte**. 14 mar. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/2397>>. Acesso em 09 maio 2023.

LOURENÇO, Sérgio O. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

MARTÍNEZ, G. M.; PIRE, C.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. M. Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100136, 2022.

MASOJIDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLIZEK, M. Photosynthesis in Microalgae. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2013. p. 21-36.

MISHRA, A.; MANDOLI, A.; JHA, B. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1093–1101, out. 2008.

OLAIZOLA, M.; GREWE, C. Commercial Microalgal Cultivation Systems. In: HALLMANN, A.; RAMPELOTTO, P. H. (Eds.). **Grand Challenges in Algae Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 3–34.

PARANHOS, Rodolfo. **Alguns métodos para análise da água**. Rio de Janeiro: UFRJ, Sub-Reitoria de Ensino de Graduação e Corpo Discente/SR-1, 1996. 200 p.

PICK, U. Adaptation of the Halotolerant Alga *Dunaliella* to High Salinity. In: LÄUCHLI, A.; LÜTTGE, U. (Eds.). **Salinity: Environment - Plants - Molecules**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. p. 97–112.

PISAL, D. S.; LELE, S. S. Carotenoid production from microalgae, *Dunaliella salina*. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 4, 2005, p.476-483.

POURKARIMI, S. *et al.* Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, p. 101771, out. 2020.

RIZWAN, M. *et al.* Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, 1 set. 2018.

SAS. **SAS Institute Inc. SAS/IML® 14.1 User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2015.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 499–508, jul. 2018.

SINGH, R. V.; SAMBYAL, K. An overview of β -carotene production: Current status and future prospects. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101717, jun. 2022.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos, RiMa, 2003.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**. Bulletin of Fisheries Research Board of Canada, 167, 1968, 311 p.

SYSTAT SOFTWARE INC. **Table Curve 2D**. Trial Version 5.01, 2014.

THRONDSSEN, J. The Planktonic Marine Flagellates. **Identifying Marine Phytoplankton**. 1997, p. 591–729. DOI: 10.1016 / b978-012693018-4 / 50007-0.

VO, T.; TRAN, D. Effects of Salinity and Light on Growth of *Dunaliella* Isolates. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 208–211, 23 jan. 2014.

WOOD, A. Michelle; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. In: ANDERSEN, Robert A (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press. 2005, p. 269-285.

WU, M. et al. Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6. **Annals of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 48, 25 jul. 2020.

XU, Y. et al. Potential of New Isolates of *Dunaliella salina* for Natural β -Carotene Production. **Biology**, v. 7, n. 1, p. 14, 1 fev. 2018.

ZHU, C. et al. Seawater desalination concentrate for cultivation of *Dunaliella salina* with floating photobioreactor to produce β -carotene. **Algal Research**. v. 35, 2018, p. 319-324. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.035>

