

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

RONALD MAURICIO TARAZONA DELGADO

**EFEITO DA DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO,
MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *Picocystis*
salinarum Lewin COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO
DE BIODIESEL**

VITÓRIA – ES

2019

RONALD MAURICIO TARAZONA DELGADO

**EFEITO DA DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO,
MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *Picocystis
salinarum* Lewin COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO
DE BIODIESEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira Fernandes

VITÓRIA - ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D352e Delgado, Ronald Mauricio Tarazona, 1993-
Efeito da depleção de nitrogênio no crescimento, morfologia e composição bioquímica de *Picocystis salinarum* Lewin como matéria-prima para a produção de biodiesel. / Ronald Mauricio Tarazona Delgado. - 2019.
71 f. : il.

Orientadora: Valéria de Oliveira Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Biomoléculas. 2. Biocombustível. 3. Microalga. 4. Nutrientes. I. Fernandes, Valéria de Oliveira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

Ronald Mauricio Tarazona Delgado

“Efeito da depleção de nitrogênio no crescimento, morfologia e composição bioquímica de *Picocystis salinarum* Lewin como matéria-prima para a produção de biodiesel”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:


Profa. Dra. Valéria de Oliveira Fernandes (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora


Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol (UFES)
Examinador Titular Interno


Prof. Dr. Paulo Wagner Pereira Antunes (CT-UFES)
Examinador Titular Externo

*Dedico este trabalho aos meus pais Efrain e Lidia,
e aos meus irmãos Beto e Perla,
pelo incentivo, carinho e por me compreender
e acreditar em mim durante estes anos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira Fernandes, pelos ensinamentos, amizade e confiança durante esses anos, além da oportunidade de vivenciar experiências importantes na minha formação acadêmica e me ajudar em cumprir minha meta de ser Mestre;

À Mayara dos Santos Guarieiro, minha querida amiga e parceira, pelo incentivo, apoio, companheirismo, carinho e colaboração durante toda a trajetória dessa etapa de minha vida. Sua companhia foi essencial durante a minha estadia no Brasil, espero que este seja apenas o começo de uma longa e duradoura amizade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), pela oportunidade de realização desse Mestrado, e ao seu corpo docente por todo conhecimento transmitido;

Aos professores constituintes da banca examinadora, Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol e Dr. Paulo Wagner Pereira Antunes, que aceitaram de bom grado contribuir para o melhoramento deste trabalho com suas críticas e sugestões;

A toda equipe do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), em especial a Mayara, Frederico, Fernando, Natalia e Laiza, pelo convívio, momentos de conversa e apoio recebido. Adicionalmente agradeço ao Frederico pelo acompanhamento em alguns dos experimentos;

Aos professores Dr. Marco Cunegundes Guimarães e Dr. Breno Valentim Nogueira, coordenadores do Laboratório de Ultraestrutura Celular 'Carlos Alberto Redins' (LUCCAR), por me permitir realizar a microscopia eletrônica de transmissão (TEM);

Ao químico Flávio Cunha Monteiro e aos doutorandos Wanderson Juvencio Keijok e Tadeu Caliman Zanardo pelo auxílio na TEM, bem como aos demais membros do LUCCAR; em especial ao Gabriel e o Sady, pela convivência agradável e por me fazerem sentir parte do seu laboratório;

Aos Professores Dr. Servio Tulio Cassini e Dr. Paulo Pereira Antunes do Laboratório de Saneamento (LABSAN), pelo apoio na análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos;

À Prof.^a Dr.^a Haydee Montoya Terreros da Universidade Nacional Mayor de San Marcos, por seu apoio, amizade e sugestões;

Ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação, da Organização dos Estados Americanos e do Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (PAEC-OEA-GCUB), por contribuir com a integração e o fortalecimento regional das Américas, através da sua oferta de estudos de Pós-Graduação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos meu pais e irmãos, por todo o apoio, conselhos, amor e preocupação durante esses anos;

Aos meus amigos Pilar, Kathy, Gabriela, Liss, Vanessa, Isabel, Bertha, Liscely, Antony, Angelo, Richard, Meche, Carolina e Zuccti; pela amizade de vocês ao longo dos anos e das distâncias;

A todos meus amigos latinos, em especial a Daniela, Juan Fernando, Hamilton e Fernando, pela amizade e fazer parte da minha vida durante estes dois anos, e que de alguma forma, tornaram isso tudo possível;

E a todos que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram com manifestações de afeto, conselhos e toda ajuda possível na realização desta pesquisa, muito obrigado.

RESUMO

Nos últimos anos, a produção de biodiesel atraiu a atenção mundial devido à consciência do esgotamento dos combustíveis fósseis, sendo a biomassa de microalgas considerada uma matéria-prima promissora. Para otimizar o processo de produção de biodiesel a partir desse recurso, a seleção da cepa e identificação de suas condições de cultivo para maximizar a produtividade de lipídios e aperfeiçoar o perfil dos ácidos graxos são necessárias. O presente estudo visa analisar o efeito de três concentrações de depleção de nitrogênio (0.5, 0.25 e 0.125 N) no crescimento, morfologia e composição bioquímica da microalga nativa *Picocystis salinarum* Lewin em dois meios de cultura (f/2 e J/1) como potencial fonte de matéria-prima para o biodiesel. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers, em triplicata e sob condições físico-químicas controladas. Foram feitas as análises de densidade celular, cinética de crescimento, massa seca, pigmentos fotossintéticos, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e determinação dos teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). A densidade celular e massa seca de *P. salinarum* diminuiu proporcionalmente com depleção de nitrogênio no meio f/2, sendo os máximos valores de $13,1 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$ e $0,96 \text{g.mL}^{-1}$ registrado no controle (1 N). No meio J/1, a depleção não influenciou nas medidas de crescimento, se registrou valores de $20,8 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$ e $0,89 \text{g.mL}^{-1}$. A depleção de nitrogênio promoveu a formação de corpos lipídicos e grãos de amido como organelas de reserva, evidenciados pela TEM. No tratamento 0.125 N do meio f/2, os corpos lipídicos apareceram de forma marcante, enquanto no meio J/1 a presença de corpos lipídicos e grãos de amido aconteceram em conjunto. O conteúdo de pigmentos também foi influenciado pela depleção de nitrogênio, no meio f/2 houve redução da clorofila *a* e *b* ($0,24$ e $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e aumento dos carotenoides ($3,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação inversamente proporcional à concentração de nitrogênio testada. A depleção no meio J/1 não causou diferença significativa nos pigmentos em relação ao controle. No meio f/2, o teor de proteínas (2,9%) e carboidratos (31%) decresceram com a depleção de nitrogênio, o teor de lipídeos (33,8%) foi elevado, chegando a ser a biomolécula mais predominante (0.125 N). A depleção de nitrogênio no meio J/1 estimulou o teor de lipídeos (22,3%) e carboidratos (32%). No tratamento 0.5 N, em ambos os meios de cultura, os ácidos graxos saturados (SFA) foram os mais representativos dos FAME, devido principalmente ao aumento do ácido palmítico. Pela concentração elevada de SFA nos tratamentos 0.5 N em ambos os meios de cultura ($996,08 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ no meio f/2 e $959,09 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ no meio J/1) e baixo nível de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) ($19,87 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ no meio f/2 e $0,37 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ no meio J/1), a biomassa de *P. salinarum* mostrou-se ideal para uso na indústria como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: biomoléculas • bicomcombustível • microalga • nutrientes

ABSTRACT

In recent years, biodiesel production has attracted worldwide attention due to the awareness of the depletion of fossil fuels, and microalgae biomass is considered a promising raw material. To optimize the biodiesel production process from this resource, the selection of the strain and identification of its cultivation conditions to maximize lipid productivity and improving the fatty acid profile are necessary. The present study aims to analyze the effect of three concentrations of nitrogen depletion (0.5, 0.25 e 0.125 N) on the growth, morphology and biochemical composition of native microalgae *Picocystis salinarum* Lewin in two culture media (f/2 and J/1) as a potential source of raw material for biodiesel. Cultures were carried out in erlenmeyers, in triplicate and under controlled physicochemical conditions. Analysis of cell density, growth kinetics, dry mass, photosynthetic pigments, transmission electron microscopy (TEM) and determination of protein, carbohydrate, lipid and fatty acid methyl ester (FAME) contents were performed. The cell density and dry mass of *P. salinarum* decreased proportionally with nitrogen depletion in the f/2 medium, with the maximum values of $13,1 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$ and $0,89 \text{ g.mL}^{-1}$ were registered in the control (1 N). In the J/1 medium, depletion didn't influence growth measures, registered values of $19,7 \pm 1,1 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$ and $0,96 \text{ g.mL}^{-1}$. Nitrogen depletion promoted the formation of lipid bodies and starch grains as reserve organelles evidenced by TEM. In the treatment of 0.125 N of the f/2 medium, the lipid bodies appeared markedly, whereas in the J/1 medium the presence of lipid bodies and starch grains occurred together. The content of pigments was also influenced by nitrogen depletion, in f/2 medium there was reduction of chlorophyll *a* and *b* ($0,24$ and $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and increased carotenoids ($3,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$) in relation inversely proportional to the concentration of nitrogen tested. Depletion in the J/1 medium didn't cause significant difference in the pigments relative to the control. In the f/2 medium, protein (2,9%) and carbohydrate (31%) content decreased with nitrogen depletion, lipid content (33,8%) was elevated, becoming the most predominant biomolecule (0.125 N). Nitrogen depletion in the J/1 medium stimulated the lipid content (22.3%) and carbohydrates (32%). In the 0.5 N treatment, in both culture media, saturated fatty acids (SFA) were the most representative of FAME, mainly due to the increase of palmitic acid. By the high concentration of SFA in the 0.5 N treatments in both culture media ($996,08 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ in f/2 medium and $959,09 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ in J/1 medium) and low level of polyunsaturated fatty acids (PUFA) ($19,87 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ in f/2 medium and $0,37 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ in J/1 medium), the biomass of *P. salinarum* proved to be ideal for use in industry as a source of raw material for the production of biodiesel.

Keywords: biomolecules • biofuel • microalgae • nutrients

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Morfologia de *Picocystis salinarum*. a. Morfotipo esférico, b. Esquema do morfotipo esférico (à esquerda) e do morfotipo trilobado (à direita). Abreviações: dictiossomo (d), núcleo (n), mitocôndria (m), parede celular (cw), amido (s), cloroplasto (c). c. Morfotipo trilobado. Imagem adaptada de Lewin et al. (2000) e Dos Santos et al. (2017).....**21**
- Figura 2:** Curvas de crescimento de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3).....**31**
- Figura 3:** Curvas de crescimento de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3).....**32**
- Figura 4:** Massa seca de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).**33**
- Figura 5:** Massa seca de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).**34**
- Figura 6:** Taxa de crescimento relativo de plantas submetidas ao gradiente de irradiância Morfologia celular de *Picocystis salinarum*. a. Morfotipo trilobado exibindo um grão de amido (organela esférica refringente) por cada lobo do cloroplasto. b. Morfotipo esférico (células subesférica e ovalada). c. Célula esférica em transição à forma trilobada. d,e. Células sob depleção de nitrogênio. As pontas das setas indicam corpos lipídicos. Escala = 5 μ m.**35**
- Figura 7:** Variação morfológica de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio.....**36**
- Figura 8:** Variação morfológica de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio.....**36**
- Figura 9:** Microscopia eletrônica de transmissão de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com diferentes concentrações de nitrogênio. a. Célula sob condições normais exibindo cloroplasto periférico. b, c, d. Células sob depleção de nitrogênio exibindo

diferentes números e tamanhos de corpos lipídicos e grãos de amido. Símbolos: cloroplasto (C), corpo lipídico (L), grão de amido (*). Escala = 0,5 µm.	38
Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Picocystis salinarum</i> no meio J/1 com diferentes concentrações de nitrogênio. a, b. Célula sob condições normais exibindo cloroplasto periférico em forma de taça. c, d. Células sob depleção de nitrogênio exibindo diferente tamanho de corpos lipídicos e cloroplasto em forma de taça contendo grãos de amido. Símbolos: cloroplasto (C), núcleo (N), corpo lipídico (L), grão de amido (*). Escala = 0,5 µm.	39
Figura 11: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de <i>Picocystis salinarum</i> no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	41
Figura 12: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de <i>Picocystis salinarum</i> no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	42
Figura 13: Teor de proteínas, carboidratos e lipídeos de <i>Picocystis salinarum</i> no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3).	43
Figura 14: Teor de proteínas, carboidratos e lipídeos de <i>Picocystis salinarum</i> no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3).	43
Figura 15: Análise de componentes principais (PCA) de <i>Picocystis salinarum</i> no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Parâmetros agrupados no mesmo eixo ortogonal estão positivamente correlacionados, enquanto aqueles em eixos opostos têm uma correlação negativa.	46
Figura 16: Análise de componentes principais (PCA) de <i>Picocystis salinarum</i> no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Parâmetros agrupados no mesmo eixo ortogonal estão positivamente correlacionados, enquanto aqueles em eixos opostos têm uma correlação negativa.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura f/2 e J/1.	24
Tabela 2: Fonte e concentração de nitrogênio das unidades experimentais.	25
Tabela 3: Parâmetros cinéticos de crescimento.	26
Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>Picocystis salinarum</i> no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	32
Tabela 5: Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>Picocystis salinarum</i> no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	33
Tabela 6: Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) da biomassa de <i>Picocystis salinarum</i> no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Abreviações: não detectado (-), não quantificado (n.q.)	45
Tabela 7: Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) da biomassa de <i>Picocystis salinarum</i> no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Abreviações: não detectado (-), não quantificado (n.q.)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

+N	Presença de nitrogênio
-N	Privação de nitrogênio
ANOVA	Análise de variância
EDTA	Ácido etilenodiminotetracético
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
k	Duplicações por dia
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de componentes principais
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
<i>r</i>	Taxa de crescimento populacional
SFA	Ácidos graxos saturados
T₂	Tempo de duplicação
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TFA	Ácido trifluoracético
UFA	Ácidos graxos insaturados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Nutrição de microalgas</i>	19
2.2 <i>Nitrogênio</i>	19
2.3 <i>Depleção de nutrientes</i>	20
2.4 <i>Picocystis salinarum</i>	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 <i>Objetivo geral</i>	23
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	23
4. HIPÓTESE	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1 <i>Cepa e condições de cultivo</i>	24
5.2 <i>Delineamento experimental</i>	25
5.3 <i>Análise de crescimento</i>	25
5.4 <i>Morfologia e estrutura celular</i>	26
5.5 <i>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</i>	27
5.6 <i>Determinação de proteínas hidrossolúveis</i>	28
5.7 <i>Determinação de carboidratos solúveis</i>	28
5.8 <i>Determinação de lipídeos totais</i>	29
5.9 <i>Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)</i>	29
5.10 <i>Análise estatística</i>	30
6. RESULTADOS	31
6.1 <i>Densidade celular</i>	31
6.2 <i>Cinética de crescimento</i>	32
6.3 <i>Massa seca</i>	33
6.4 <i>Morfologia e estrutura celular</i>	34
6.5 <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	40
6.6 <i>Proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais</i>	43
6.7 <i>Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)</i>	44
6.8 <i>Análise de componentes principais (PCA)</i>	46
7. DISCUSSÃO	48
7.1 <i>Efeito da depleção de nitrogênio na densidade celular, cinética de crescimento e massa seca</i>	48

7.2 Efeito da depleção de nitrogênio na morfologia e estrutura celular ...	49
7.3 Efeito da depleção de nitrogênio nos pigmentos fotossintéticos	52
7.4 Efeito da depleção de nitrogênio nas proteínas, carboidratos e lipídeos	54
7.5 Efeito da depleção de nitrogênio no perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)	57
7.6 Potencial uso da biomassa de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel.....	58
7.7 Considerações finais sobre a depleção de nitrogênio	59
8. CONCLUSÕES	62
9. REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO

O uso continuado de combustíveis derivados do petróleo é amplamente reconhecido como insustentável e tem sido considerado uma preocupação global nesta década devido ao esgotamento de seus estoques e à enorme emissão de gases do efeito estufa na atmosfera que contribuem às mudanças climáticas (CHISTI, 2007; SHUBA; KIFLE, 2018; TAN et al., 2018).

Diante deste cenário, há uma necessidade constante de encontrar outras alternativas aos produtos petrolíferos (TANDON; JIN, 2017), de modo que o biodiesel se tornou opção em potencial para o diesel fóssil, uma vez que é renovável e ecologicamente correto (RAWAT et al., 2013). Os biocombustíveis proporcionam benefícios ambientais, já que seu uso leva a redução nas emissões prejudiciais de dióxido de carbono e à eliminação das emissões de óxidos de enxofre (SHUBA; KIFLE, 2018).

O biodiesel pode ser derivado a partir de culturas alimentares; de sementes oleaginosas comestíveis (girassol, palma, soja, coco), consideradas matérias-primas de primeira geração (NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014). No entanto, este combustível alternativo derivado de culturas oleaginosas terrestres poderá causar escassez no suprimento de alimentos e desmatamento, se for realizado em uma produção massiva (TAN et al., 2018). Culturas não alimentares; de sementes não comestíveis (pinhão bravo, karanja, jojoba, mahua), resíduos de óleos alimentares e gorduras animais, ganharam importância nos últimos anos como matéria-prima de segunda geração; ainda assim, estes não são suficientes para substituir completamente as necessidades atuais dos biocombustíveis (NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014).

A biomassa de microalgas é considerada como a matéria-prima de terceira geração para o biodiesel, oferecendo potencialmente maiores oportunidades a longo prazo e é uma fonte promissora para uma grande variedade de subprodutos derivados dela (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014; TANDON; JIN, 2017; SHUBA; KIFLE, 2018).

As microalgas parecem ser a única fonte de biodiesel renovável capaz de atender a demanda global por combustíveis, devido à sua alta taxa de crescimento, elevada eficiência fotossintética e capacidade de sintetizar um elevado teor de lipídios em suas células como componentes de membrana e produtos de

armazenamento (CHISTI, 2007; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; CHEN et al., 2018; TAN et al., 2018). O uso de microalgas para produzir biodiesel não compromete a produção de alimentos; portanto, a competição por terra arável é reduzida, requer menos água em comparação com plantas cultivadas e produz numerosos derivados biológicos de valor agregado com aplicações comerciais não apenas exclusivas para biocombustíveis; mas também, produtos farmacêuticos, aditivos alimentares, cosméticos, entre outros (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; TANDON; JIN, 2017).

Para otimizar o processo de produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas, a bioprospecção é um passo vital na seleção da cepa e identificação de suas condições de cultivo para maximizar a produtividade de lipídios e melhorar o perfil dos ácidos graxos (DUONG et al., 2012; SAN PEDRO et al., 2013; RIZZA et al., 2017).

Embora muitas cepas de microalgas ricas em lipídios já tenham sido estudadas, há uma grande quantidade de espécies nativas em diferentes ambientes inexplorados que podem ter um potencial ainda maior para a produção de biodiesel (REN et al., 2013; COBOS et al., 2017; RIZZA et al., 2017). As microalgas nativas de ambientes aquáticos que apresentam condições adversas (alta ou baixa salinidade, pH ou nutrientes) ao serem adaptadas ao laboratório são favoráveis a apresentar rápido crescimento e gerar um alto teor de substâncias de reserva (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; DUONG et al., 2012).

Com base em sua fisiologia, cepas de microalgas podem ser cultivadas tanto em água doce, quanto em água marinha. Para evitar a competição com outras culturas no uso de água doce e contribuir significativamente na economia do biodiesel que requer grandes quantidades de biomassa de microalgas (e, portanto, elevadas quantidades de água para o seu cultivo), a seleção de uma cepa cultivável com base na água do mar é obrigatória (SAN PEDRO et al., 2013). Pelo que a escolha da cepa é restrita a microalgas marinhas ou microalgas continentais que toleram salinidade elevada (halófilas).

Após a eleição da cepa, em muitos casos será necessário manipular sua composição bioquímica para elevar o teor lipídico, o que pode ser feito alterando as condições de cultivo como luz, temperatura ou nutrientes (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). A depleção ou a privação total de nitrogênio

é considerada a maneira mais simples e eficaz de elevar o conteúdo lipídico das algas (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Existem diversos estudos na literatura que investigam o efeito das condições nutricionais do cultivo sobre a composição bioquímica das microalgas e a sua viabilidade no uso como matéria-prima com fins biotecnológicos. O presente estudo visa contribuir para o conhecimento dos aspectos fisiológicos (crescimento, morfologia e composição bioquímica) da espécie nativa *Picocystis salinarum* sob depleção de nitrogênio, utilizando um meio de cultura típico para microalgas marinhas (meio f/2) e outro específico para microalgas halófilas (meio J/1). Propõe-se sugerir o uso de sua biomassa como potencial fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nutrição de microalgas

A necessidade de fornecer nutrientes minerais para as plantas e algas em cultura é conhecida há muito tempo. No entanto, até hoje novas formulações e modificações de receitas conhecidas são testadas, especialmente para espécies de microalgas com potencial para aplicações biotecnológicas (GROBBELAAR, 2013).

Muitos estudos foram realizados para determinar as concentrações ótimas de nutrientes que atenda às necessidades de um grupo majoritário das algas. Vonshak (1986) identificou os principais requisitos para o desenvolvimento de meios de cultura para as microalgas: a salinidade (que é determinado pelo habitat de onde o microorganismo é oriundo), a composição em termos dos principais componentes iônicos como K^+ , Mg_2^+ , Na^+ , Ca_2^+ , SO_4^{-2} e Cl^- , a fonte de nitrogênio, a fonte de carbono ou CO_2 ou HCO_3^- , o pH, os oligoelementos, o agente quelante como o ácido etilenodiminotetracético (EDTA) e as vitaminas.

Uma consideração importante no cultivo de microalgas que visa alcançar altos rendimentos é assegurar o suprimento adequado dos componentes supracitados. Na verdade, os meios de cultura são formulados de tal forma que os nutrientes são fornecidos adequadamente para garantir que eles nunca se tornem o fator limitante de crescimento. No entanto, deve ser lembrado que um excesso de nutrientes pode ser tóxico. Por outro lado, em aplicações específicas, os nutrientes são propositadamente fornecidos em concentrações limitantes para a produção de β -caroteno, carboidratos ou ácidos graxos em algumas espécies de microalgas (GROBBELAAR, 2013).

2.2 Nitrogênio

O nitrogênio é um dos principais nutrientes necessários para o crescimento de microalgas. As mudanças na sua disponibilidade controlam a estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica nos ecossistemas aquáticos (REYNOLDS, 2006).

Este elemento participa da composição de biomoléculas essenciais, como os ácidos nucléicos (DNA, RNA), proteínas, enzimas, pigmentos (clorofilas) e moléculas de transferência de energia como o trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP). O teor de nitrogênio da biomassa de microalgas pode

variar entre 1% a 10%, e não só varia entre diferentes grupos de microalgas, mas também dentro da espécie dependendo da oferta e disponibilidade do elemento no meio (GROBBELAAR, 2013).

As microalgas anabolizam o nitrogênio na forma inorgânica como íons amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-); mas também na forma orgânica, como a ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). O principal caminho para a assimilação do nitrogênio é através do sistema enzimático da glutamina sintetase, através do qual o glutamato reage com o amônio (energeticamente acionado pelo ATP) para formar o aminoácido glutamina (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Em escala laboratorial, o nitrato é a forma nitrogenada mais comumente utilizada nos meios sintéticos para o cultivo de microalgas e cianobactérias, sendo os mais empregados o nitrato de sódio (NaNO_3), e em menor proporção, o nitrato de potássio (KNO_3) (GROBBELAAR, 2013).

2.3 Depleção de nutrientes

Em resposta à variabilidade ambiental e nutricional, as microalgas podem sofrer uma série de aclimações metabólicas que, frequentemente, resultam em variações na composição de suas macromoléculas como carboidratos, lipídios, proteínas e pigmentos (CHIA et al., 2013). Portanto, sua composição bioquímica pode ser manipulada em laboratório para aumentar a síntese e o acúmulo de uma determinada biomolécula a partir da indução de estresse nutricional (ÖRDÖG et al., 2012).

A depleção e privação de nutrientes é uma das abordagens mais utilizadas para direcionar vias metabólicas para a síntese de lipídios em microalgas. Neste cenário, as microalgas acumulam lipídios como principal meio de armazenamento sob limitação de nutrientes quando a fonte de energia (luz) está disponível. Embora tenha sido relatado que nutrientes inorgânicos como fósforo e ferro canalizam o fluxo metabólico para a biossíntese de lipídeos, o nitrogênio é considerado o fator limitante nutricional mais efetivo no desencadeamento de altos teores de óleos (COURCHESNE et al., 2009).

Spoehr e Milner (1949) foram os primeiros a mostrarem que a deficiência de nitrogênio induz aumento significativo no teor de lipídios em uma microalga verde

(*Chlorella pyrenoidosa*). Esses achados foram posteriormente estendidos para outras espécies de microalgas.

2.4 *Picocystis salinarum*

Picocystis salinarum Lewin (Chlorophyta) é uma microalga halófila pertencente ao picoplâncton (organismos que não excedam uma dimensão celular de 3 µm), ocorrente apenas em ambientes aquáticos continentais salinos. O gênero forma uma linhagem filogenética separada, constituindo assim sua própria classe, Picocystophyceae (HEPPERLE; KRIENITZ; HOLLIBAUGH, 2001; GUILLOU et al., 2004; KRIENITZ et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2017).

P. salinarum é caracterizada por possuir um conjunto muito específico de pigmentos com um padrão incomum de carotenoides, contendo a presença de pigmentos de outras linhagens de algas como diatoxantina e monadoxantina que são geralmente encontradas em diatomáceas e criptófitas, respectivamente (LEWIN et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2017).

No ambiente e nos primeiros dias de cultivo em escala laboratorial, a grande maioria das células são de morfotipo esférico ou ligeiramente ovais, com aproximadamente 2-3 µm de diâmetro. Cada célula tem um cloroplasto parietal, geralmente em forma de taça e bilobado (Fig. 1a, 1b). A reprodução é por autosporulação gerando duas células filhas, e não há evidência de reprodução sexual. No decorrer dos dias do seu cultivo no laboratório, em fase de senescência, as células possuem um morfotipo trilobado com um diâmetro de 3-4 µm. Os dois lobos laterais contêm partes do cloroplasto, enquanto o lobo central contém o núcleo (Fig. 1b, 1c) (LEWIN et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2017).

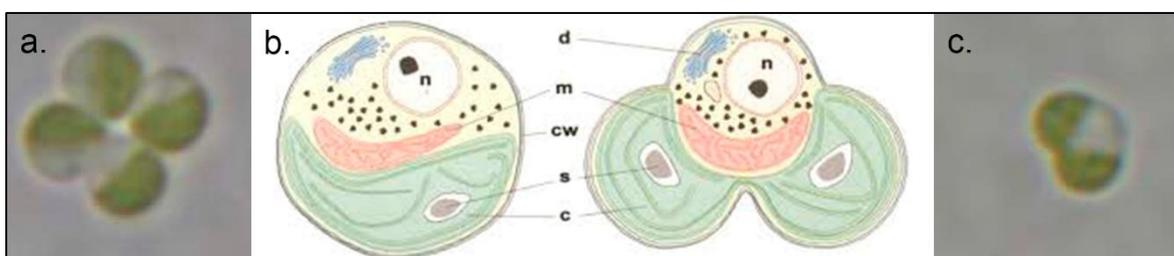


Figura 1. Morfologia de *Picocystis salinarum*. a. Morfotipo esférico, b. Esquema do morfotipo esférico (à esquerda) e do morfotipo trilobado (à direita). Abreviações: dictiossomo (d), núcleo (n), mitocôndria (m), parede celular (cw), amido (s), cloroplasto (c). c. Morfotipo trilobado. Imagem adaptada de Lewin et al. (2000) e Dos Santos et al. (2017).

Poucos gêneros possuem uma morfologia completamente diferente quando cultivados em escala laboratorial, e que o mesmo (neste caso, o morfotipo trilobado) constitua o caráter fenotípico para a identificação do gênero (LEWIN et al., 2000; DELGADO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2017).

Devido à sua posição chave como produtor primário com alta taxa de produção nas cadeias alimentares de habitats salinos e sua plasticidade metabólica (KRIENITZ et al., 2012), estudos relatam a *P. salinarum* como uma espécie potencial para uso biotecnológico, como a biorremediação de águas poluídas por metais pesados (BEN ALI et al., 2017) e por compostos intermediários na produção de plásticos (BEN OUADA et al., 2018). Além disso, Wang et al. (2014) apontam o uso de sua biomassa como potencial fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel ao observar um aumento substancial nos corpos lipídicos durante o seu cultivo sob limitação de nitrogênio.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar o efeito da depleção de nitrogênio no crescimento, morfologia e composição bioquímica de *Picocystis salinarum* Lewin como matéria-prima para a produção de biodiesel.

3.2 *Objetivos específicos*

- Cultivar a microalga *P. salinarum* em dois meios de cultura e sob três diferentes concentrações de depleção de nitrogênio.
- Determinar a densidade celular, cinética de crescimento e massa seca.
- Analisar as variações morfológicas e estruturais.
- Caracterizar o teor dos pigmentos fotossintéticos, proteínas, carboidratos, lipídeos e perfil de ácidos graxos.
- Discutir o potencial uso da biomassa na produção de biodiesel.

4. HIPÓTESE

O cultivo da microalga *Picocystis salinarum* na menor concentração de depleção de nitrogênio causará diminuição do crescimento (densidade, parâmetros cinéticos e massa seca), conteúdo de pigmentos fotossintéticos, proteínas e carboidratos; porém, aumento no teor de lipídeos e síntese de ácidos graxos promissores para o seu uso como matéria-prima na produção de biodiesel.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cepa e condições de cultivo

A cepa *Picocystis salinarum* USM 303650 foi obtida do Herbário do Museu de História Natural 'Javier Prado' da Universidade Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Peru). Os cultivos foram desenvolvidos no meio f/2 (GUILLARD, 1975) e no meio modificado de Johnson (J/1) (BOROWITSKA, 1988), os quais foram preparados com água do mar (35 ppm NaCl) que foi previamente filtrada. O pH dos meios de cultura foi corrigido para 8 e a esterilização foi feita por autolavagem (121 °C, 20 min). Os cultivos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (29 ± 1 °C), intensidade luminosa ($47,25 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) obtida por meio de lâmpadas fluorescentes 40 W do tipo *daylight*, fotoperíodo (12: 12 h, claro: escuro) e aeração constante.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura f/2 e J/1

Componente	Meio f/2	Meio J/1
	(mg.L ⁻¹)	
NaNO ₃	75	-
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5	-
Na ₂ SiO ₃	30	-
MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	1500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	500
KNO ₃	-	1000
FeCl ₃ · 6H ₂ O	31,5	2,44
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	43,6	1,89
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,8	0,041
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22	-
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,1	0,051
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,098	0,06
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,063	-
KCl	-	200
CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	200
NaHCO ₃	-	43
KH ₂ PO ₄	-	35
H ₃ BO ₃	-	0,61
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	-	0,38
ZnCl ₂	-	0,041
Tiamina · HCl (vitamina B ₁)	0,01	-
Biotina (vitamina H)	0,005	-
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂)	0,005	-

5.2 Delineamento experimental

Foi testado a depleção de nitrogênio no cultivo de *P. salinarum* nos meios de cultura f/2 e J/1. Considerando-se o controle como a concentração original (100%) do nitrogênio no meio f/2 ($75 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$), foram manipuladas as concentrações de 50%, 25% e 12.5%, recebendo as denominações 1 N, 0.5 N, 0.25 N e 0.125 N, respectivamente. No meio J/1 ($1000 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KNO}_3$) foi avaliado também a depleção de nitrogênio com o mesmo critério mencionado (Tab. 2).

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 3 L, contendo 2,7 L do meio de cultura e 0,3 L do inoculo ($9,5 \pm 0,5 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$) por um período de vinte dias, para depois serem centrifugados e liofilizados para uso da biomassa na realização de diversos testes. Os tratamentos e controles foram realizados em triplicata ($n = 3$). Todas as manipulações dos cultivos foram feitas em câmara de fluxo laminar (Pachane PCR T3, Brasil).

Tabela 2. Fonte e concentração de nitrogênio das unidades experimentais

	Fonte	(mg.L^{-1})
100% Nitrogênio (1 N)		
Meio f/2	NaNO_3	75
Meio J/1	KNO_3	1000
50% Nitrogênio (0.5 N)		
Meio f/2	NaNO_3	37,5
Meio J/1	KNO_3	500
25% Nitrogênio (0.25 N)		
Meio f/2	NaNO_3	18,75
Meio J/1	KNO_3	250
12,5% Nitrogênio (0.125 N)		
Meio f/2	NaNO_3	9,375
Meio J/1	KNO_3	125

5.3 Análise de crescimento

5.3.1 Densidade celular e cinética de crescimento

Para a determinação da densidade celular (cel.mL^{-1}) das unidades experimentais, alíquotas de 1 mL foram retiradas e fixadas com lugol acético 5% a cada dois dias até o final do experimento. Contagens diretas em hemocítmetro modificado Neubauer foram feitas em microscópio óptico (Olympus CX41, Japão). A partir dos valores de densidade celular foram elaborados a curva e os parâmetros

da cinética de crescimento (Tab. 3); a taxa de crescimento populacional (r), duplicações por dia (k) e o tempo de duplicação (T_2), segundo as equações descritas por Wood, Everroad e Wingard (2005).

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de crescimento

Taxa de crescimento populacional (r)	Duplicações por dia (k)	Tempo de duplicação (T_2)
$r = \frac{\text{Ln}(N_t / N_0)}{\Delta t}$	$k = \frac{\text{Log}_2(N_t / N_0)}{\Delta t}$	$T_2 = \frac{0.6931}{r}$
N_0 = densidade celular (cel.mL ⁻¹) no início de um intervalo de tempo N_t = densidade celular (cel.mL ⁻¹) no final de um intervalo de tempo Δt = intervalo de tempo ($t_t - t_0$) em dias		

5.3.2 Determinação da massa seca

A quantificação da massa seca foi realizada por gravimetria a cada intervalo de quatro dias até o final do experimento. Foram filtradas amostras de 20 mL em microfiltro de fibra de vidro GF-1 (Macherey Nagel, Alemanha); diâmetro 47 mm, previamente secos em estufa a 60 °C e pesados. Após filtragem, os filtros foram mantidos em estufa a 60 °C até atingirem peso constante. A determinação da biomassa seca (g.L⁻¹) se deu através da subtração da massa final pela massa inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado.

5.4 Morfologia e estrutura celular

5.4.1 Variação morfológica

No ato da contagem celular também foi registrado (cada quatro dias até o final do experimento) se a constituição dos cultivos eram células pertencentes ao morfotipo esférico (morfologia esférica, subesférica ou ovalada) ou ao morfotipo trilobado. Para tal fim, o valor da densidade celular foi expresso como 100%, sendo composta unicamente entre os dois morfotipos mencionados.

5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Foi realizado seguindo a metodologia proposta por Spurr (1969) com algumas modificações. Usou-se 0,05 mg de biomassa de microalgas, a qual foi lavada em PBS na temperatura ambiente (± 25 °C). Posteriormente, usou-se um fixador composto por glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, que reagiu por 2 h a temperatura ambiente para depois continuar com a reação a 4 °C por 12 h. Em

seguida foram realizadas três lavagens consecutivas usando novamente tampão cacodilato 0,1 M com tempo de reação de 10 min. A pós-fixação da amostra foi realizada por 30 min a temperatura ambiente e no escuro, usando OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,1 M e K₄Fe(CN)₆ 1,25% (1:1).

Uma nova lavagem foi feita com tampão cacodilato 0,1 M por 10 min seguido de duas lavagens com água destilada por 10 min. O processo de desidratação da amostra foi realizado com banhos de acetona 30%, 50%, 70% e 90% por 10 min, e finalmente três vezes em acetona 100% também por 10 min. Para a infiltração da amostra em resina, misturou-se acetona 100% com epon (1:1) a temperatura ambiente por 12 h. Após terminado o tempo da infiltração, foi feito a inclusão da amostra em epon puro, também, a temperatura ambiente por 12 h. Para o emblocamento, as amostras tratadas com o epon puro foram transferidas para forminhas apropriadas que foram solidificadas em estufa a 60 °C por 48h.

Posteriormente os blocos foram cortados a 60 nm em ultramicrótomo (PowerTome PT-XL, Estados Unidos), e os cortes fixados com acetato de uranila 5% por 30 min, lavados com água destilada, fixados com citrato de chumbo 1% por 30 min e lavados com água destilada. Os cortes fixados foram montados em grades de malha n°400 revestidas com formvar (Ted Pella Inc., Estados Unidos). As imagens foram obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400 (JEOL, Brasil) operado a 120 kV com um filamento LaB6.

5.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

As concentrações dos pigmentos clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram determinadas por meio da espectrofotometria a cada quatro dias de intervalo até o final do experimento. Alíquotas de 20 mL foram retiradas dos cultivos e filtradas em microfiltro de fibra de vidro GF-1. A extração dos pigmentos se deu através da maceração dos microfiltros com o material retido, usando acetona 90% a frio. Após a maceração, a solução foi acondicionada em tubos de centrifuga envoltos por papel alumínio e armazenados a 4 °C por 24 h para depois ser levada a centrifugação e o sobrenadante lido em espectrofotômetro (AquaMate Plus UV-VIS, Thermo Scientific) nos comprimentos de onda indicados. Todo o processo foi realizado na ausência de luz.

Para a quantificação das concentrações das clorofilas *a* e *b* (µg.L⁻¹) foram utilizadas as fórmulas propostas por Jeffrey e Humphrey (1975), e para estimar os

carotenoides totais foi utilizada a equação desenvolvida por Strickland e Parsons (1968).

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{)} = 11,85 \times A_{664 \text{ nm}} - 1,54 \times A_{647 \text{ nm}} - 0,08 \times A_{630 \text{ nm}}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{)} = 21,03 \times A_{647 \text{ nm}} - 5,43 \times A_{664 \text{ nm}} - 2,66 \times A_{630 \text{ nm}}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{)} = 7,60 \times A_{480 \text{ nm}} - 3,0 A_{750 \text{ nm}} - 1,49 \times A_{510 \text{ nm}} - 2,0 \times A_{750 \text{ nm}}$$

5.6 Determinação de proteínas hidrossolúveis

Foi aplicado o método descrito por Lowry et al. (1951). As amostras contendo 5 mg da biomassa liofilizada foram submetidas à hidrólise alcalina com 4 mL de NaOH 1 N a 100 °C em banho-maria por 1 h. Após esfriar, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 min para a obtenção do extrato alcalino. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi transferida para um tubo, onde adicionou-se 5 mL de uma solução composta por Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1 N, CuSO₄ 0,5% e KNaC₄H₄O₆ 1%, na proporção 100:1:1, respectivamente. A mistura foi agitada em vortex e deixada em repouso durante 10 min. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu em água destilada na proporção 1:1, homogeneizado novamente em vortex e deixando repousar por 30 min para a realização da leitura em espectrofotômetro a 750 nm. A curva padrão foi elaborada a partir de uma solução de albumina 300 µg.mL⁻¹, realizando um gradiente de concentração de 0 até 250 µg.mL⁻¹. O teor de proteínas (%) foi apresentado como miligramas de proteínas por grama de biomassa seca.

5.7 Determinação de carboidratos solúveis

Foi determinado pelo método de Kochert (1978). Foram pesados 5 mg de amostra liofilizada submetendo à hidrólise alcalina com 4 mL de NaOH 1 N, o qual foi aquecido em banho-maria a 100 °C por 1 h. Após esfriar a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min. Retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino e foram transferidos para um tubo, adicionando-se 1 mL de NaOH 1 N e 0,05 mL de fenol 4%, seguindo de agitação em vortex. Após esfriar em temperatura ambiente por 30 min, foram acrescentados 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi deixada em repouso para esfriar e foi lida em espectrofotômetro a 485 nm. A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de glicose anidra 300 µg.mL⁻¹, realizando um gradiente de concentração de 0 até 250 µg.mL⁻¹. O teor de carboidratos (%) foi apresentado como miligramas de carboidratos por grama de biomassa seca.

5.8 Determinação de lipídeos totais

Foi determinado usando o método descrito por Bligh e Dyer (1959). A biomassa liofilizada foi transferida para um tubo onde foram adicionados 2 mL de água destilada para cada 0,5 g de biomassa, respeitando-se as proporções quando em quantidades menores. À biomassa úmida foi adicionado 7,5 mL de solução clorofórmio: metanol (1:2), seguido de agitação em vortex por 2 min. Foi adicionado 2,5 mL de clorofórmio, sendo novamente agitado por 30 s e em seguida foi adicionado 2,5 mL de água destilada seguido de agitação em vortex por 30 s. A biomassa foi separada por centrifugação a 3500 rpm por 8 min a 4 °C para depois transferir a fase orgânica para um Becker que foi levado a estufa a 30 °C para secagem (evaporação dos reagentes) até atingir massa constante, restando somente os lipídeos totais na forma sólida. O teor de lipídeos (%) foi apresentado em miligrama de lipídeo por grama de biomassa seca.

5.9 Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)

Os ácidos graxos foram determinados através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos ésteres metílicos da biomassa de microalgas.

5.9.1 Transesterificação da biomassa microalgal

Foi realizado seguindo a metodologia proposta por Menezes et al. (2013) com algumas modificações. Em um tubo de ensaio pesou-se 200 mg da biomassa de microalgas. A seguir, adicionaram-se 3 mL de solução 0,5 M NaOH em metanol seguido de aquecimento em banho-maria a 70 °C por 10 min. Resfriou-se o tubo de ensaio em banho de gelo e adicionou-se 9 mL de uma mistura esterificante composta por 2 g de NH₄Cl, 60 mL de metanol e 3 mL de H₂SO₄ concentrado que foi levado previamente a rotaevaporador a 150 rpm por 15 min.

Aqueceu-se, novamente, o tubo de ensaio em banho-maria a 70 °C por 10 min, resfriou-se em banho de gelo e adicionou-se 5 mL de heptano e 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado em vortex por 30 s e se colocou em repouso a temperatura ambiente até a separação de fases. A fase heptânica foi coletada e liofilizada por 48 h, para posteriormente ser analisada por cromatografia.

5.9.2 Análise cromatográfica

A análise das amostras foi realizada em um sistema de cromatografia da série Shimadzu CBM-20A (Japão), equipado com um desgaseificador de solventes DGU-20AS, uma bomba quaternária de gradiente LC-20AT, um injetor automático de

amostras SIL-20AHT e um detector de arranjo de diodos SPD-M20A. A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna analítica Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 nm). O comprimento de onda de detecção foi de 210 nm. O volume de injeção para as análises foi de 50 µL da amostra e a vazão da fase móvel foi de 0,250 mL.min⁻¹.

Em todas as análises, a coluna permaneceu acondicionada à temperatura constante de 37 °C utilizando um módulo aquecedor de coluna da Shimadzu. A solução de H₂O:TFA (99,9:0,1 v.v⁻¹) foi utilizada como fase móvel A, enquanto a fase B foi composta por acetonitrila. A vazão utilizada nas análises foi de 0,250 mL.min⁻¹. O perfil do gradiente iniciou-se com 70% da fase móvel B. Entre 0 e 12 min aplicou-se um gradiente linear de acetonitrila variando a porcentagem da fase móvel B de 70 a 90%. Entre 12 e 32 min, o gradiente linear variou de 90 a 100%.

Entre 32 e 32,5 min, o gradiente retornou à condição inicial e manteve-se até o re-equilíbrio da coluna. Todas as soluções preparadas para compor as fases móveis foram previamente filtradas e desgaseificadas por 15 min em banho de ultrassom (Limpsonic, Brasil) antes de serem utilizadas.

5.9.3 Validação do método

Os ésteres foram dissolvidos em solução de acetonitrila e a solução padrão de 10 µg.mL⁻¹ foi estocada a -20 °C. A curva analítica foi obtida pela injeção das seguintes soluções padrões: Dodecanato (C12:0), Linolenato (C18:3), Miristato (C14:0), Linoleato (C18:2), Palmitato (C16:0) e Oleato (C18:1) com concentrações entre 0,2 e 2,0 µg.mL⁻¹ (Anexo 1). Os dados foram processados utilizando o software LCSolutions 2.1. O coeficiente de correlação, a inclinação e o intercepto da curva padrão, bem como a tabela de análise de variância e os respectivos erros padrões foram calculados para verificar a validação do modelo linear da equação utilizada para padronizar o método de quantificação.

5.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$). A análise de componentes principais (PCA) foi usada para determinar a relação entre todos os parâmetros analisados. A ANOVA e o teste *post hoc* foram feitos usando o software SPSS 20.0 e a PCA foi feita com o software XLSTAT 2018.

6. RESULTADOS

6.1 Densidade celular

A Fig. 2 apresenta as curvas de crescimento dos cultivos de *Picocystis salinarum* submetidos a diferentes concentrações de nitrogênio no meio f/2. A depleção de nitrogênio (0.5, 0.25 e 0.125 N) apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) na densidade celular a partir do 12º dia de cultivo. A partir deste período, a concentração 1 N proporcionou os valores mais elevados de densidade celular até o final do cultivo (atingindo até $13,1 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$ no 20º dia), seguido dos tratamentos 0.5, 0.25 e 0.125 N, respectivamente.

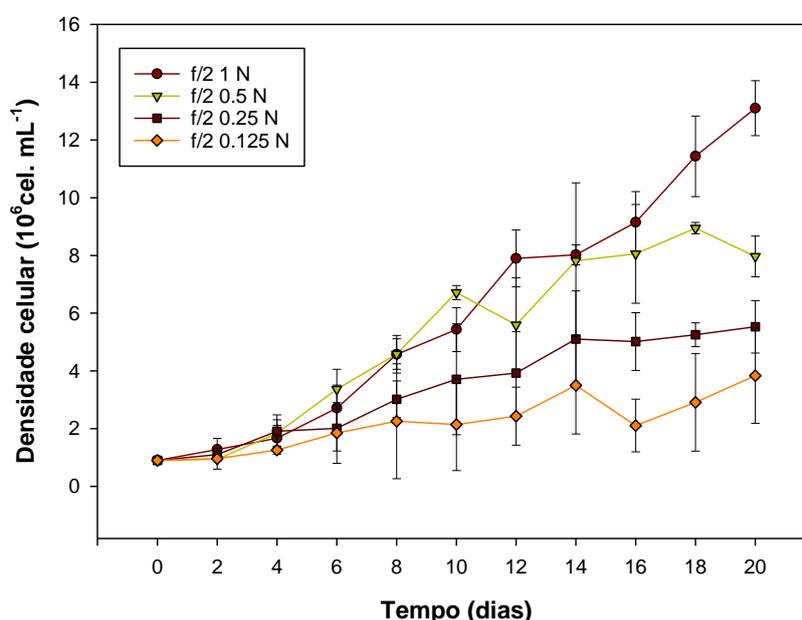


Figura 2. Curvas de crescimento de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão ($n = 3$).

Já, as curvas de crescimento de *P. salinarum* com diferentes concentrações de nitrogênio no meio J/1 (Fig. 3) demonstraram que ao longo do período de cultivo a densidade celular não variou significativamente ($p > 0,05$). Porém, do 16º dia em diante, verificou-se que os tratamentos com maior depleção de nitrogênio (0.25 e 0.125 N) obtiveram uma densidade celular superior quando comparado com as demais unidades experimentais (1 e 0.5 N), sendo os seus valores máximos registrados no 20º dia de $19,7 \pm 1,1 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$ e $15,4 \pm 1,8 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$, respectivamente.

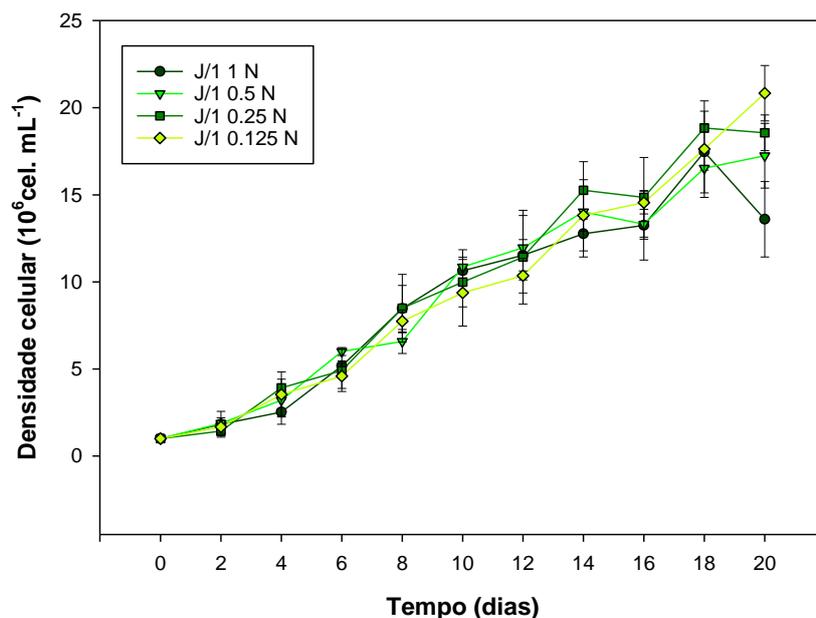


Figura 3. Curvas de crescimento de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão ($n = 3$).

6.2 Cinética de crescimento

Os valores de taxa de crescimento (r), duplicações por dia (k) e tempo de duplicação (T_2) de *P. salinarum* nos meios de cultura f/2 e J/1 estão apresentados nas tabelas 4 e 5, respectivamente. No meio f/2 foi observado que nas maiores concentrações de nitrogênio (1 e 0.5 N) obteve-se os maiores valores de r e k , seguido dos tratamentos 0.25 e 0,125 N respectivamente (Tab. 4). Em relação ao T_2 , os tratamentos com maior depleção de nitrogênio (0.125 e 0.25 N) apresentaram os maiores valores para este parâmetro, seguido dos tratamentos 0.5 e 1 N que foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Tabela 4. Parâmetros cinéticos de crescimento de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	r (d ⁻¹)	k (d ⁻¹)	T_2 (d)
f/2 1 N	0,134 ± 0,004 a	0,193 ± 0,005 a	5,183 ± 0,146 b
f/2 0.5 N	0,109 ± 0,005 ab	0,157 ± 0,007 ab	6,373 ± 0,274 b
f/2 0.25 N	0,090 ± 0,008 bc	0,130 ± 0,011 bc	7,713 ± 0,643 ab
f/2 0.125 N	0,070 ± 0,020 c	0,100 ± 0,029 c	10,464 ± 2,659 a

Para o meio J/1 (Tab. 5), todos os tratamentos de depleção de nitrogênio (0.5, 0.25 e 0.125 N) proporcionaram os maiores valores de r e k em comparação com o

controle (1 N). Em contrapartida, o T_2 foi maior nas duas maiores concentrações (1 e 0.5 N).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	r (d^{-1})	k (d^{-1})	T_2 (d)
J/1 1 N	0,130 ± 0,008 b	0,188 ± 0,011 b	5,339 ± 0,304 a
J/1 0.5 N	0,142 ± 0,005 ab	0,205 ± 0,008 ab	4,879 ± 0,176 ab
J/1 0.25 N	0,156 ± 0,003 a	0,211 ± 0,004 a	4,749 ± 0,092 b
J/1 0.125 N	0,152 ± 0,004 a	0,219 ± 0,006 a	4,570 ± 0,119 b

6.3 Massa seca

A Figura 4 e 5 mostram a variação da concentração da massa seca dos cultivos de *P. salinarum* ao longo do tempo sob diferentes concentrações de nitrogênio nos meios testados. Observa-se que no 4º dia de cultivo no meio f/2 (Fig. 4), a massa seca não se diferenciou entre os tratamentos ($p > 0,05$).

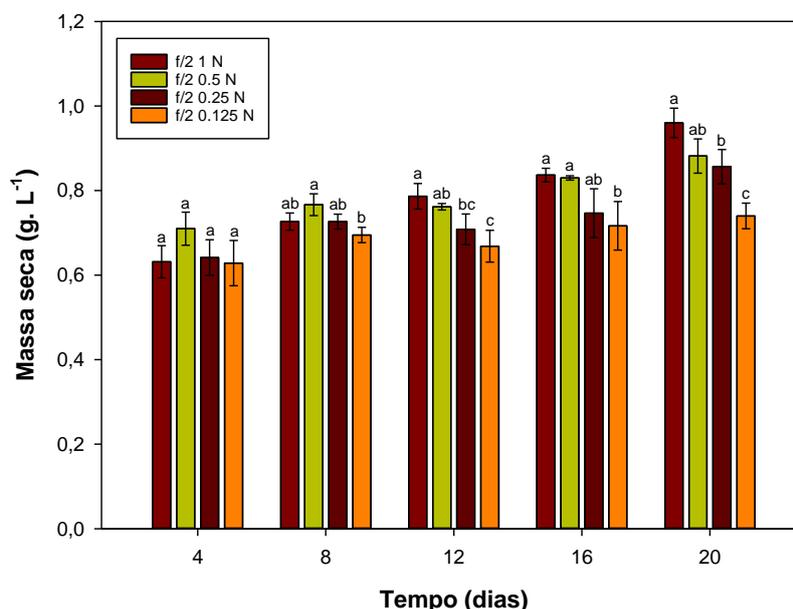


Figura 4. Massa seca de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão ($n = 3$). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No 8º dia, as três concentrações superiores de nitrogênio começaram a sobressair em relação à menor concentração, sendo que no 20º dia o maior valor

de massa seca foi obtida em 1 N ($0,96 \text{ g.L}^{-1}$) e 0.5 N ($0,88 \text{ g.L}^{-1}$). Enquanto que os tratamentos 0.25 e 0.125 N obtiveram $0,86$ e $0,74 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Fig. 4).

Entre o 8° e 16° dia de cultivo, a massa seca dos tratamentos no meio J/1 não mostraram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Entretanto, no final do cultivo a concentração 1 N apresentou valor superior ($0,89 \text{ g.L}^{-1}$) em comparação as concentrações 0.5 e 0.25 N ($0,81$ e $0,80 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente), seguido do tratamento 0.125 N que registrou valor de $0,76 \text{ g.L}^{-1}$ (Fig. 5).

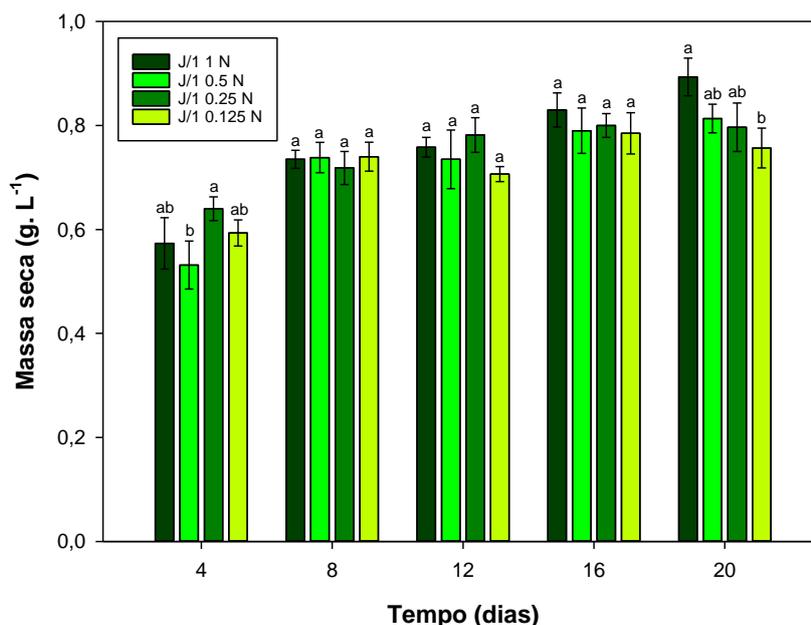


Figura 5. Massa seca de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão ($n = 3$). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.4 Morfologia e estrutura celular

As variações morfológicas de *P. salinarum* (Fig. 6) entre os morfotipos esférico e trilobado durante o cultivo nos meios de cultura f/2 e J/1 estão apresentadas nas figuras 7 e 8, respectivamente. Em todos os dias de análise, o morfotipo esférico foi predominante em todas as unidades experimentais de ambos meios de cultura.

No meio f/2, em todas as concentrações de nitrogênio testadas (Fig. 7), prevaleceu o morfotipo esférico das células de *P. salinarum*, alcançando o valor máximo de densidade celular percentual ($91,75 \pm 0,25\%$) no 4° dia de cultivo. Durante os demais dias, apesar da predominância, houve diminuição deste morfotipo em 1, 0.5 e 0.25 N. Em relação ao morfotipo trilobado, a densidade celular

percentual alcançou seu valor máximo (30%) no 20° dia de cultivo no controle (1 N). Diferente dos demais tratamentos, a densidade celular percentual deste morfotipo em 0.125 N diminuiu ao longo dos dias até alcançar 2% no 20° dia de cultivo.

Nos cultivos realizados utilizando o meio J/1 (Fig. 8), também houve predominância do morfotipo esférico em todas as unidades experimentais em comparação com o trilobado. Entretanto, notou-se valores superiores do morfotipo trilobado em relação ao meio f/2, onde o máximo valor de densidade celular percentual obtido (38%) ocorreu na concentração 1 N no 20° dia.

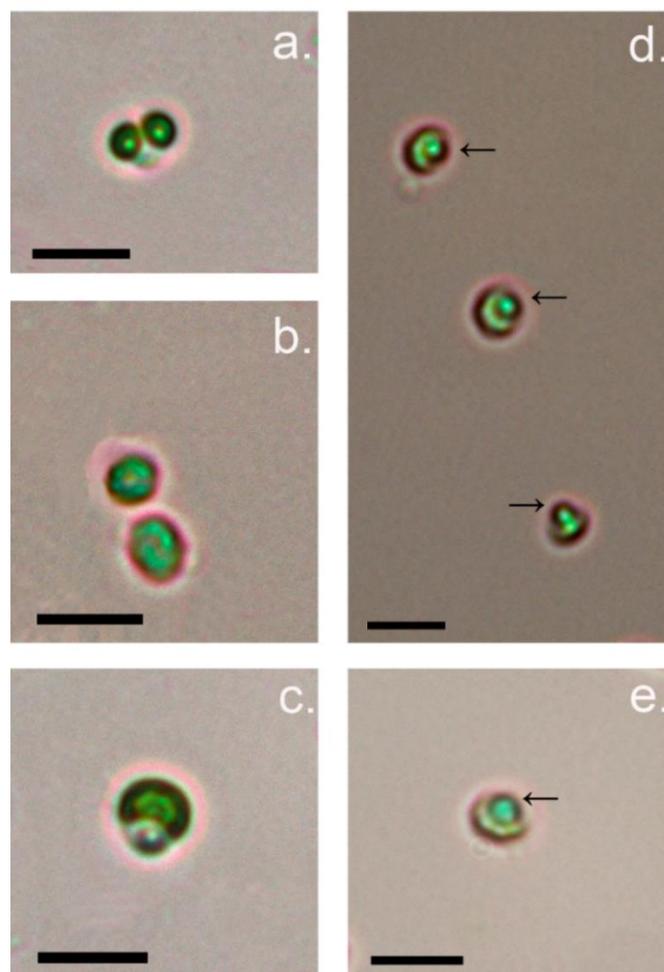


Figura 6. Morfologia celular de *Picocystis salinarum*. a. Morfotipo trilobado exibindo um grão de amido (organela esférica refringente) por cada lobo do cloroplasto. b. Morfotipo esférico (células subesférica e ovalada). c. Célula esférica em transição à forma trilobada. d,e. Células sob depleção de nitrogênio. As pontas das setas indicam corpos lipídicos. Escala = 5 µm.

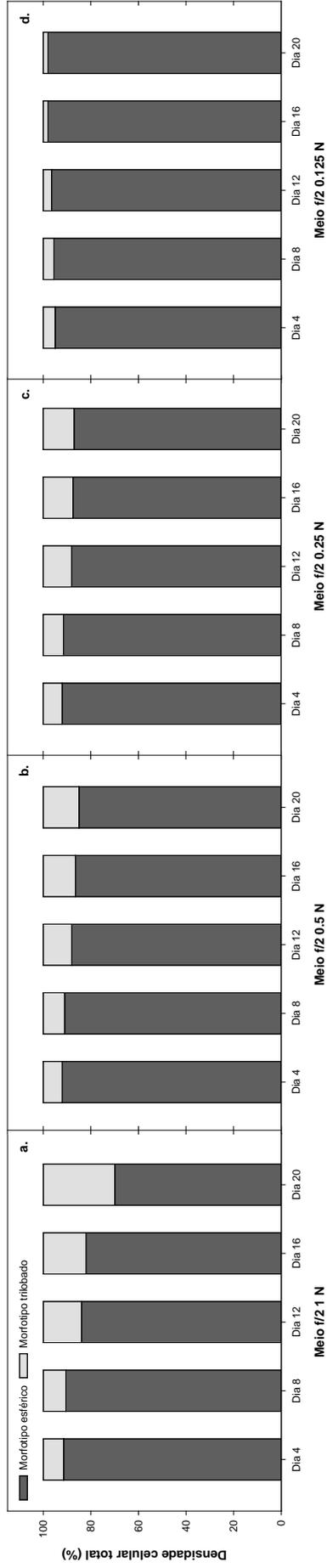


Figura 7. Variação morfológica de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio.

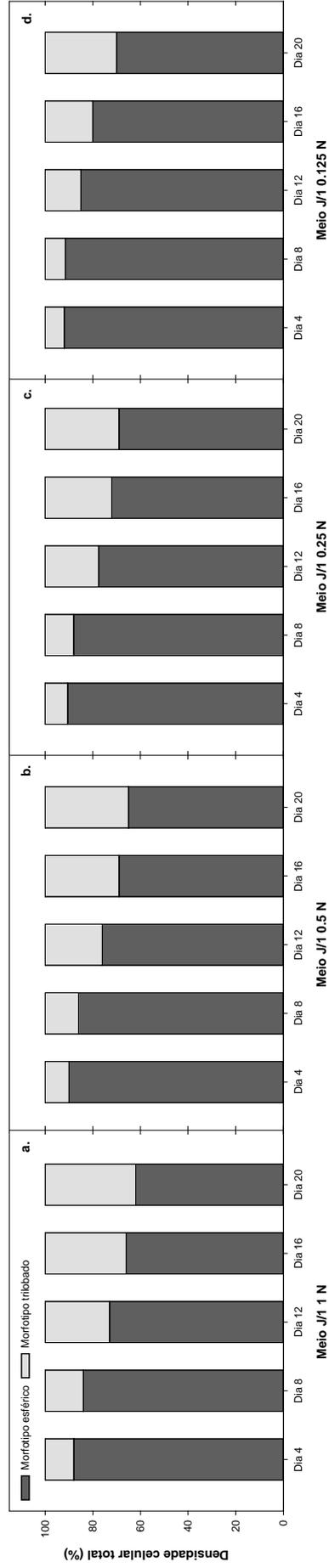


Figura 8. Variação morfológica de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) revelou que as células de *P. salinarum* sob diferentes concentrações de depleção de nitrogênio sofreram mudanças morfológicas e estruturais. No meio f/2, observou-se que a maioria das células do controle (1 N) mostraram o cloroplasto como a organela que cobria a maior parte do citoplasma (Fig. 9a). Porém, nos tratamentos de depleção de nitrogênio essa organela diminuiu até quase se tornar imperceptível. Além disso, apareceram organelas armazenadoras de substâncias de reserva (Fig. 9b, 9c, 9d) como grãos de amido (carboidratos) e corpos lipídicos (lipídeos) em diferentes números e tamanhos nos tratamentos 0.5, 0.25 e 0.125 N, respectivamente.

Essa tendência foi observada também na TEM das células de *P. salinarum* no meio J/1 (Fig. 10), onde a maior parte das células em 1 N (Fig. 10a) e 0.5 N (Fig. 10b) possuíam o cloroplasto como a organela mais proeminente no citoplasma. Entretanto nos tratamentos com maior depleção; 0.25 N (Fig. 10c) e 0.125 N (Fig. 10d), apareceram as duas organelas de reserva já mencionadas.

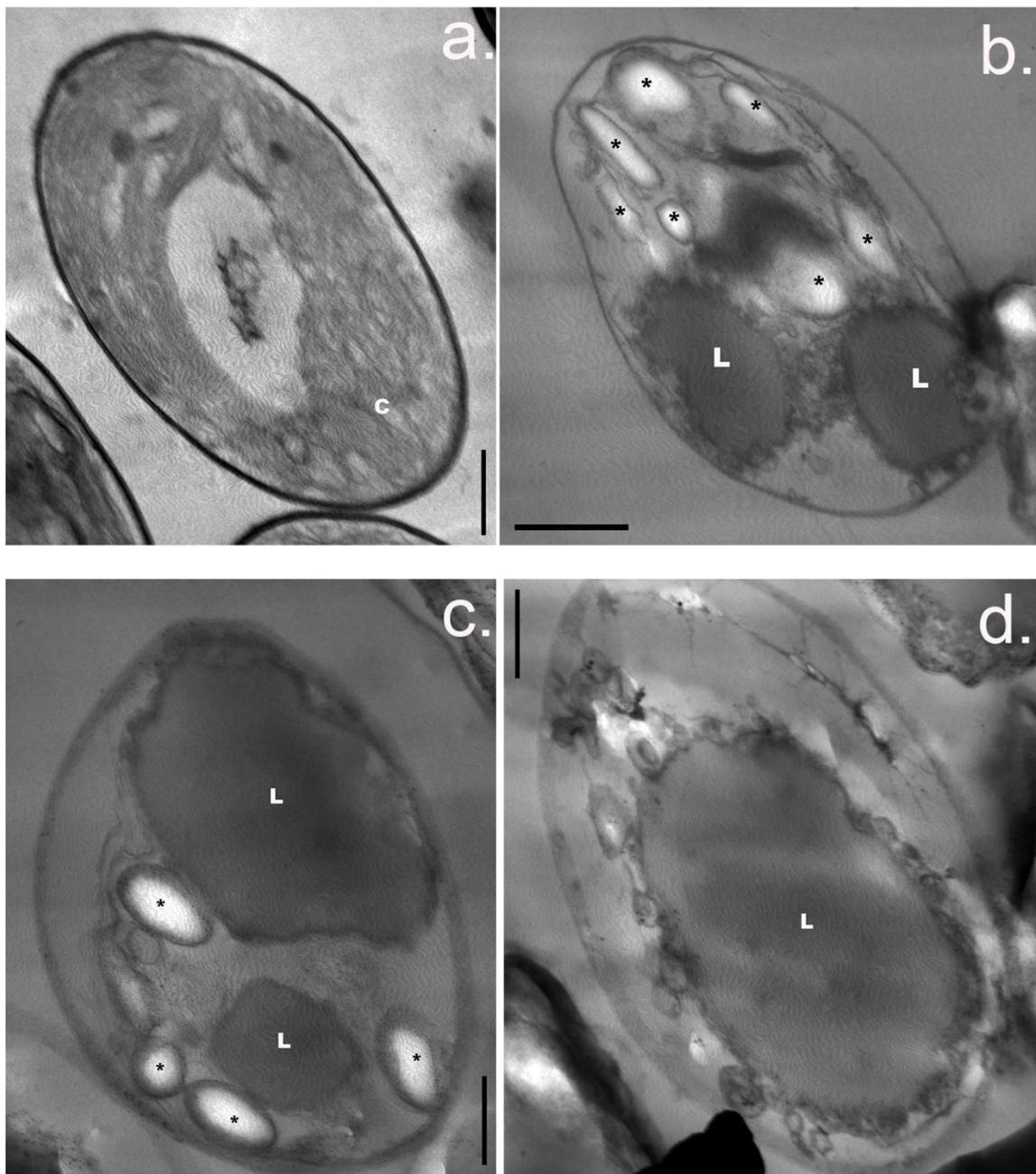


Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com diferentes concentrações de nitrogênio. a. Célula sob condições normais exibindo cloroplasto periférico. b, c, d. Células sob depleção de nitrogênio exibindo diferentes números e tamanhos de corpos lipídicos e grãos de amido. Símbolos: cloroplasto (C), corpo lipídico (L), grão de amido (*).

Escala = 0,5 μ m.

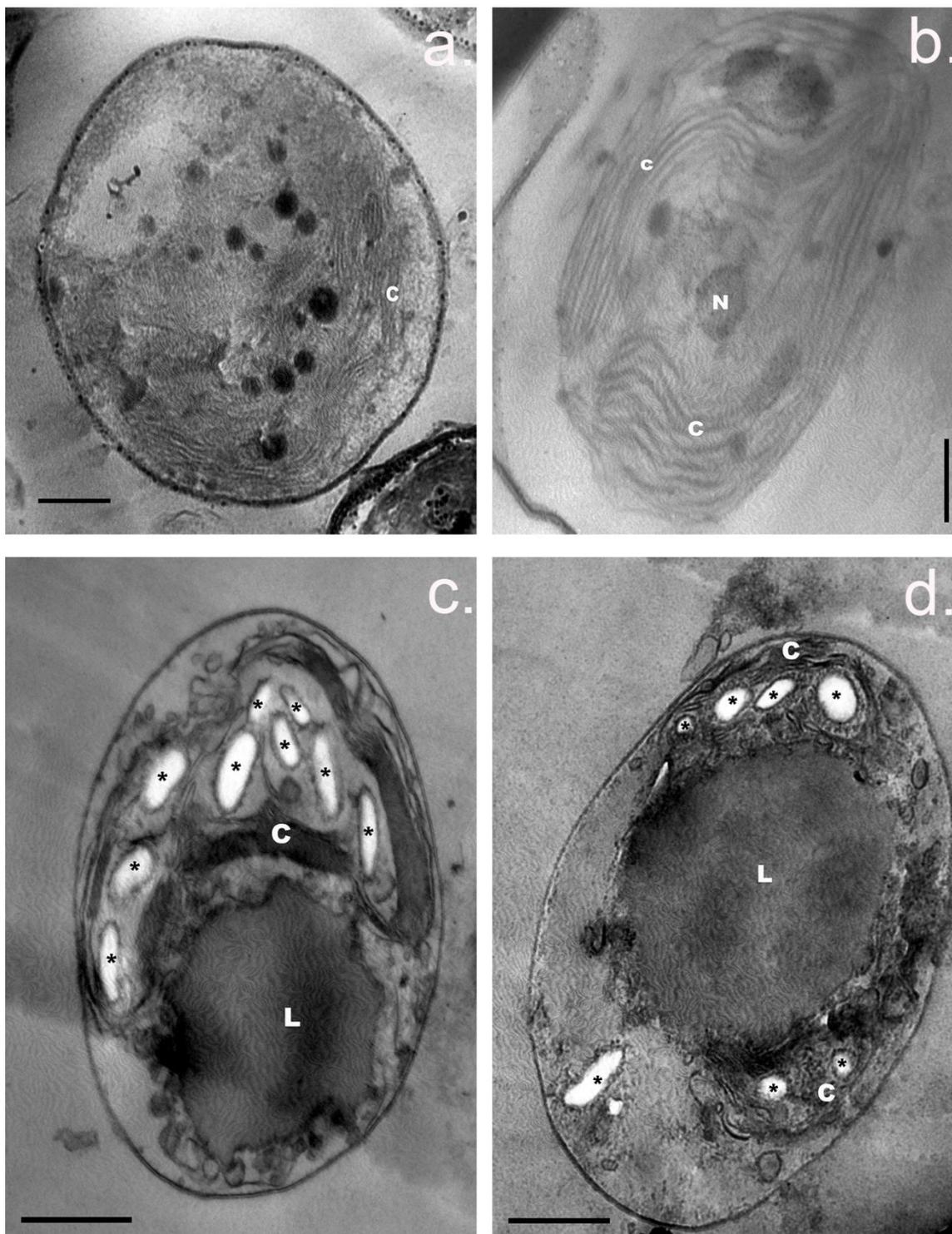


Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com diferentes concentrações de nitrogênio. a, b. Célula sob condições normais exibindo cloroplasto periférico em forma de taça. c, d. Células sob depleção de nitrogênio exibindo diferente tamanho de corpos lipídicos e cloroplasto em forma de taça contendo grãos de amido. Símbolos: cloroplasto (C), núcleo (N), corpo lipídico (L), grão de amido (*). Escala = 0,5 μm .

6.5 Pigmentos fotossintéticos

Os valores das concentrações dos pigmentos cloroplastídicos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) estão apresentados na Fig. 11 (meio f/2) e Fig. 12 (meio J/1). No 8º dia de cultivo no meio f/2, as maiores concentrações de clorofila *a* de *P. salinarum* foram encontradas no controle (1 N) e no tratamento 0.5 N (Fig. 11a). A partir do 12º dia observa-se um notório aumento deste pigmento em 1 N (2,73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), cuja concentração foi mantida superior até o final do cultivo em relação aos tratamentos 0.5, 0.25 e 0.125 N, respectivamente.

Essa tendência foi encontrada também para a clorofila *b*, onde a partir do 12º dia, o valor do pigmento supracitado aumentou consideravelmente em 1 N. Porém, foi a partir do 16º dia que a concentração de clorofila *b* (0,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) obteve diferença significativa em relação aos tratamentos 0.5, 0.25 e 0.125 N, respectivamente.

A concentração de carotenoides (Fig. 11c) apresentou comportamento contrário ao das clorofilas *a* e *b*, aumentando proporcionalmente com a depleção de nitrogênio e com o tempo do cultivo. A partir do 12º dia de cultivo o tratamento 0.125 N apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de carotenoides em relação aos demais tratamentos (0.25 e 0.5 N) e ao controle, respectivamente, com máximo valor registrado no 20º dia (3,35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) para os diferentes tratamentos e controle no meio J/1 (Fig. 12) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo dos dias de cultivo. As maiores concentrações dos pigmentos supracitados foram registradas no 20º dia de cultivo em 1 N, onde, a clorofila *a* correspondeu a 2,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, clorofila *b* 0,88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e carotenoides 1,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

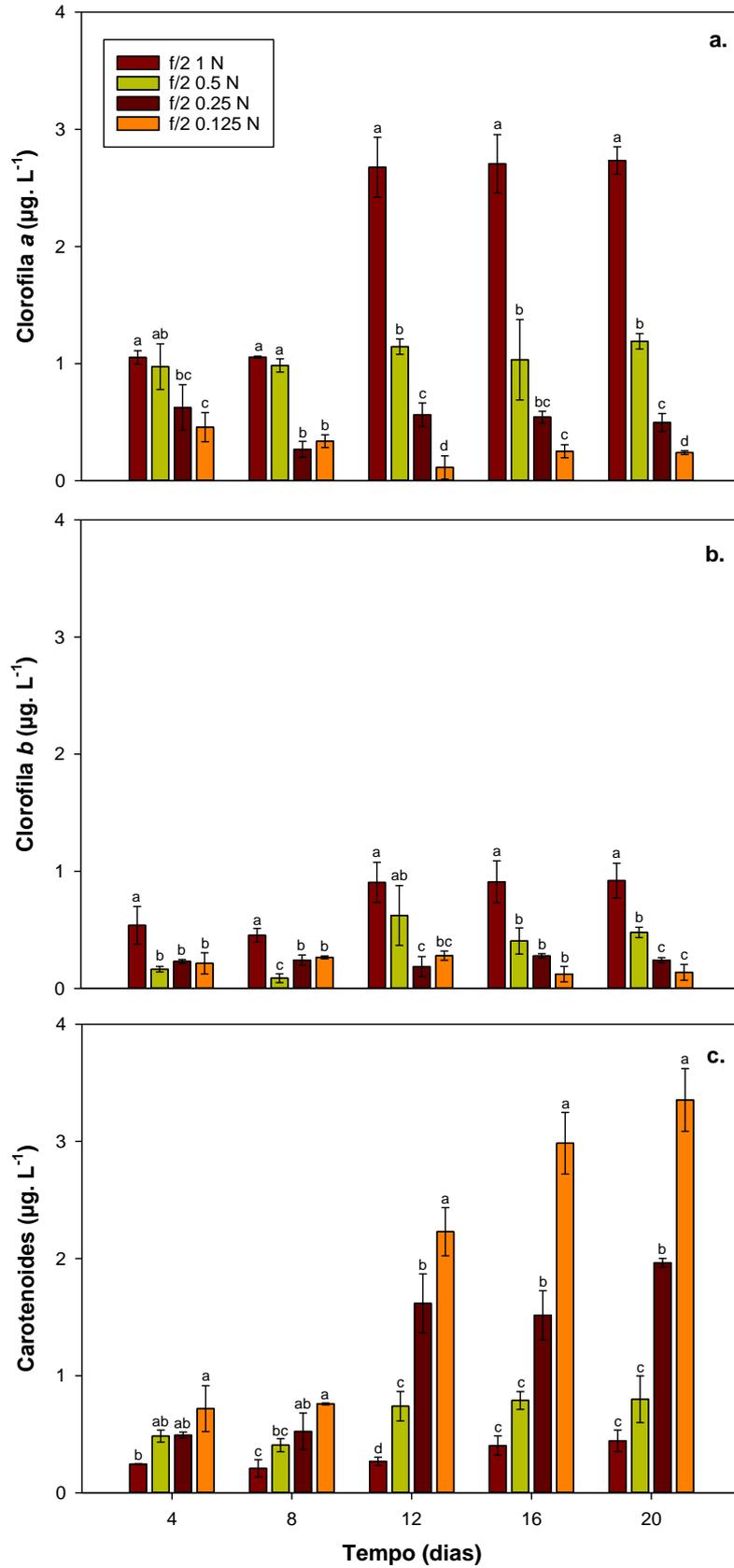


Figura 11. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

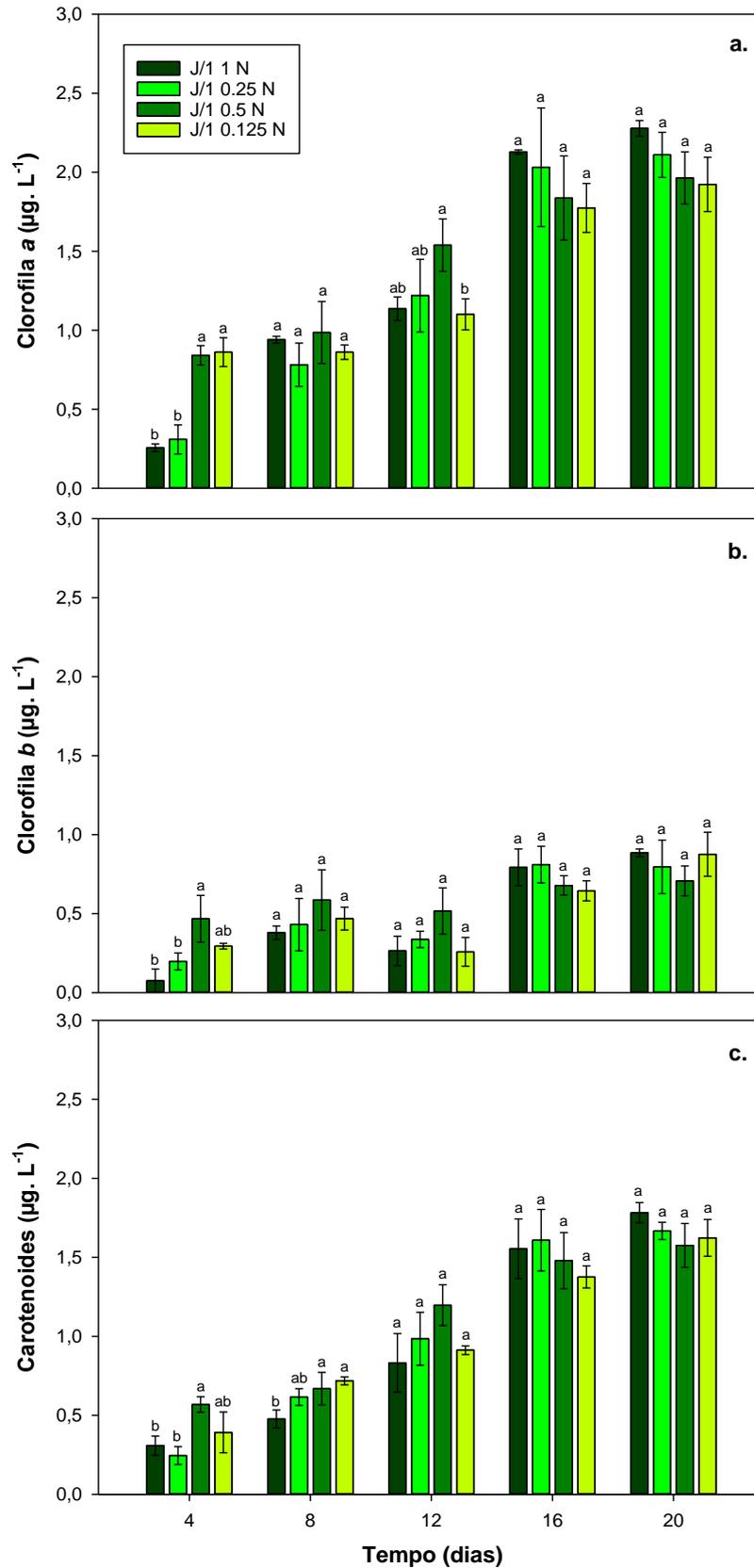


Figura 12. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.6 Proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais

Os valores obtidos nas análises do teor final de biomoléculas (proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais) dos cultivos de *P. salinarum* sobre depleção de nitrogênio nos meios f/2 e J/1 estão representados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

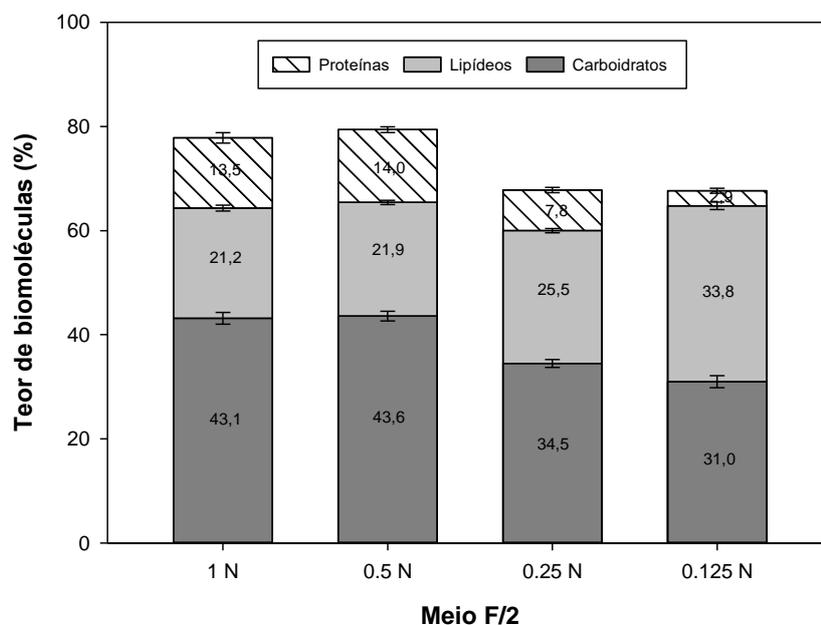


Figura 13. Teor de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3).

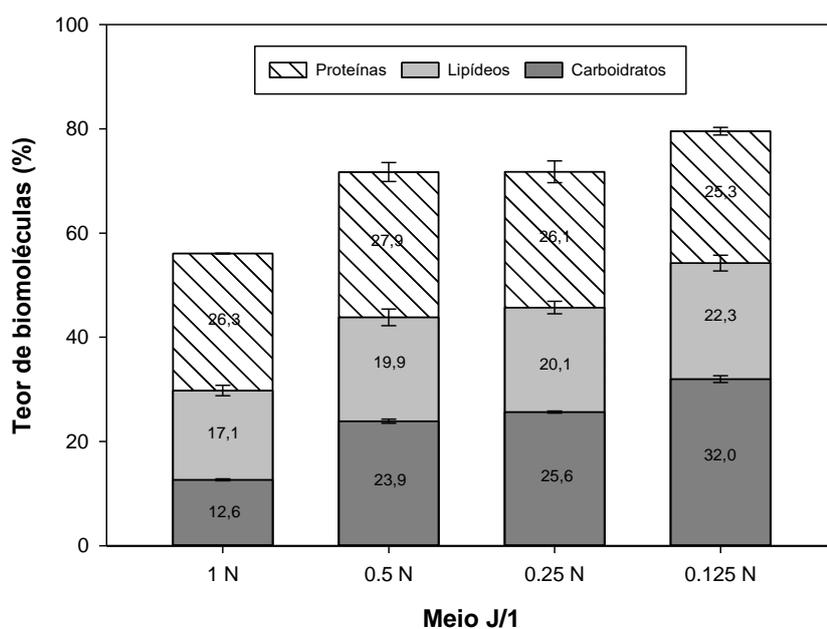


Figura 14. Teor de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Barras de erro representam o desvio padrão (n = 3).

Da mesma forma que nos testes anteriores, foi realizado a análise de variância (ANOVA) independentemente para cada biomolécula. O ANOVA seguido do teste de Tukey demonstrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de proteínas para as concentrações de nitrogênio no meio f/2, com valores máximos de 13,5 % em 1 N e 14 % em 0.5 N e o menor 2,9 % em 0.125 N. No caso do meio J/1, o teor de proteínas em todos os tratamentos não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), com valor médio de $26,6 \pm 1,3\%$.

Com relação aos teores de carboidratos no meio f/2, o teste de Tukey formou dois grupos com resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). O controle (1 N) e o tratamento 0.5 N apresentaram maior teor, cujo valor médio foi $43,35 \pm 0,25\%$ de carboidratos. Os demais tratamentos (0.25 e 0.125 N) apresentaram valor médio inferior ($32,75 \pm 1,75\%$) desta biomolécula. Em contrapartida, no meio J/1 o maior teor de carboidratos foi observado no tratamento 0.125 N (32%) e o menor no 1 N (12,6%).

Para os teores de lipídeos no meio f/2, o maior valor (33,8%) foi obtido no tratamento 0.125 N segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). Resultado semelhante foi encontrado no meio J/1, onde o tratamento 0.25 N proporcionou maior teor (22,3%) desta biomolécula, seguido das concentrações 0.25 e 0.5 N ($20 \pm 0,1\%$) e o controle (17,1%).

6.7 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)

A composição dos FAME de *P. salinarum* com diferentes depleções de nitrogênio nos meios f/2 e J/1 estão listados nas tabelas 6 e 7, respectivamente. Os ácidos graxos foram classificados como ácidos graxos saturados (SFA) e insaturados (UFA). Os SFA detectados foram o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0). Os UFA foram divididos em monoinsaturado (MUFA), como o ácido oleico (C18:1), e poliinsaturados (PUFA), como o ácido linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3).

No controle do meio f/2, *P. salinarum* produziu principalmente o ácido láurico ($274,01 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$). Mas, nos tratamentos com depleção de nitrogênio o valor desse ácido graxo diminuiu ou não foi sintetizado. Em relação ao ácido palmítico, houve aumento em todos os tratamentos, sendo o ácido de maior ocorrência dentre os SFA (com valor máximo de $923,95 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ em 0.5 N). Em consequência de sua predominância, os SFA foram superiores aos UFA. Nos tratamentos 0.25, 0.125 N

e controle (1 N), a ocorrência do ácido oleico apresentou valores consideráveis ($175,31 \pm 78,93 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) dentro dos UFA, enquanto o ácido linolênico (PUFA) foi o ácido que menos se expressou, não ultrapassando os $1,64 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ (Tab. 6).

Tabela 6. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) da biomassa de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Abreviações: não detectado (-), não quantificado (n.q.).

	1 N	0.5 N	0.25 N	0.125 N
Láurico (C12:0)	274,01 a	-	53,53 c	157,83 b
Mirístico (C14:0)	59,15 b	72,13 ab	79,65 a	28,99 c
Palmítico (C16:0)	59,24 d	923,95 a	721,96 b	300,49 c
Oleico (C18:1)	111,32 b	0,61 c	254,24 a	96,38 b
Linoleico (C18:2)	16,99 a	19,87 a	18,07 a	n.q.
Linolênico (C18:3)	0,92 a	n.q.	1,64 a	n.q.
SFA	392,40 c	996,08 a	855,15 a	487,31 b
UFA	129,23 b	20,48 c	273,95 a	96,38 b
MUFA	111,32 b	0,61 c	254,24 a	96,38 b
PUFA	17,91 a	19,87 a	19,70 a	n.q.

Da mesma forma, dos SFA de *P. salinarum* no meio J/1 (Tab. 7) o ácido palmítico foi mais sintetizado no tratamento 0.5 N ($859,21 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) seguido pelo controle ($295,67 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$). Entretanto, nos tratamentos 0.25 e 0.125 N ocorreu considerável diminuição desse ácido ($1,825 \pm 0,675 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$).

Tabela 7. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) da biomassa de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Abreviações: não detectado (-), não quantificado (n.q.).

	1 N	0.5 N	0.25 N	0.125 N
Láurico (C12:0)	-	19,74 c	36,06 b	132,31 a
Mirístico (C14:0)	18,81 b	80,14 a	1,23 c	1,73 c
Palmítico (C16:0)	295,67 b	859,21 a	1,15 c	2,50 c
Oleico (C18:1)	42,21 c	2,19 d	76,25 b	440,07 a
Linoleico (C18:2)	16,02 a	0,37 c	0,19 c	9,92 b
Linolênico (C18:3)	n.q.	n.q.	n.q.	0,17 a
SFA	314,48 b	959,09 a	38,44 d	136,54 c
UFA	58,23 b	2,56 c	76,44 b	450,16 a
MUFA	42,21 c	2,19 d	76,25 b	440,07 a
PUFA	16,02 a	0,37 c	0,19 c	10,09 b

Em relação ao ácido láurico, os tratamentos supracitados apresentaram valores elevados ($84,185 \pm 48,125 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$) tornando-se o maior contribuinte dos SFA. Embora seja um valor relevante dentro dos SFA, os UFA se mostraram superiores ao total de FAME. Em contrapartida, no tratamento 0.5 N e controle, a presença dos SFA se mostrou superior em relação aos UFA em detrimento da ocorrência elevada do ácido palmítico ($295,67$ e $859,21 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$, respectivamente). Dentro dos UFA, o teor de MUFA (ácido oleico) foi superior aos PUFA em todas as unidades experimentais (Tab. 7).

6.8 Análise de componentes principais (PCA)

Para a realização dos PCA em ambos meios de cultura foram utilizados todos os parâmetros quantitativos analisados. No caso das análises que envolveram registros durante todo o período de cultivo (densidade celular, massa seca, pigmentos fotossintéticos e variação morfológica), foram considerados só os valores obtidos no último dia de análise (20^o dia).

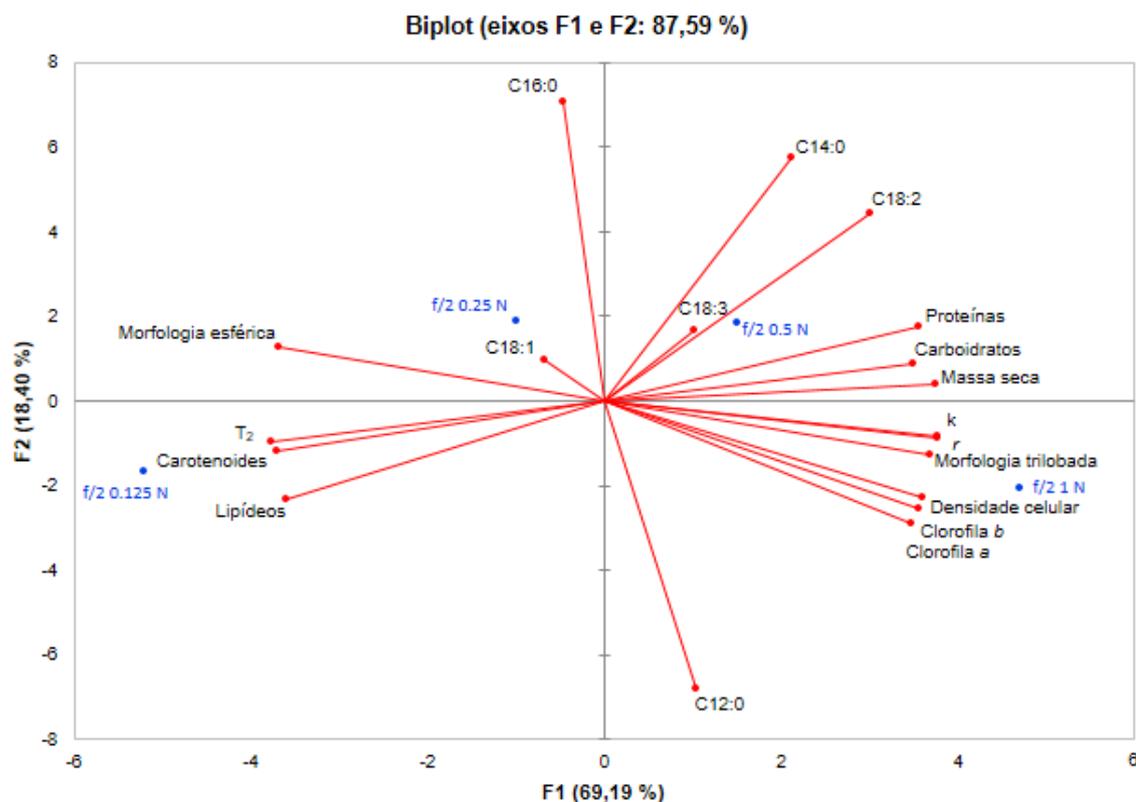


Figura 15. Análise de componentes principais (PCA) de *Picocystis salinarum* no meio f/2 com concentrações de depleção de nitrogênio. Parâmetros agrupados no mesmo eixo ortogonal estão positivamente correlacionados, enquanto aqueles em eixos opostos têm uma correlação negativa.

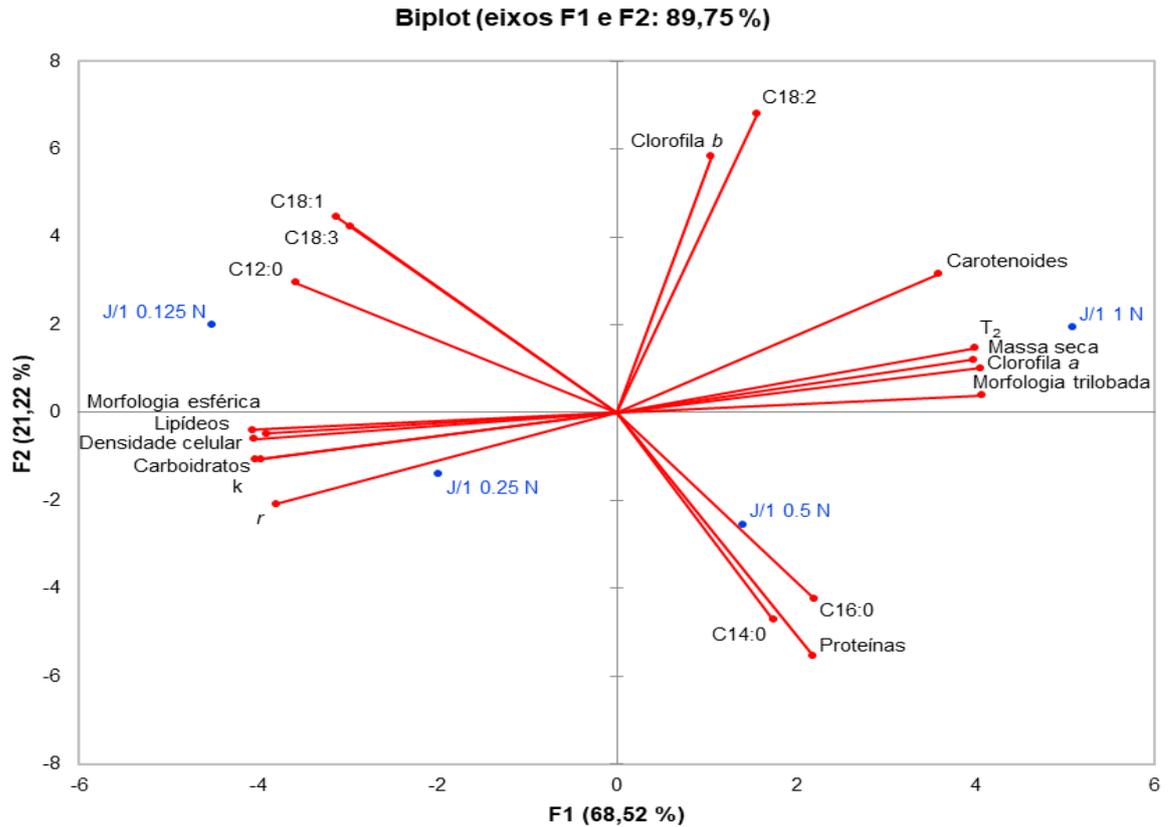


Figura 16. Análise de componentes principais (PCA) de *Picocystis salinarum* no meio J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio. Parâmetros agrupados no mesmo eixo ortogonal estão positivamente correlacionados, enquanto aqueles em eixos opostos têm uma correlação negativa.

A PCA permitiu revelar a existência ou não de relações entre os parâmetros medidos e seus agrupamentos entre o controle e os tratamentos. Os parâmetros que se encontram agrupados no mesmo eixo ortogonal estão positivamente correlacionados, enquanto aqueles que estão em eixos opostos têm uma correlação negativa.

7. DISCUSSÃO

7.1 Efeito da depleção de nitrogênio na densidade celular, cinética de crescimento e massa seca

Uma das consequências da privação ou limitação de nutrientes no cultivo de microalgas é a possível diminuição da densidade celular, taxas de crescimento e produção de biomassa (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012; SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012). A depleção ou a privação de nitrogênio (-N) afeta principalmente a capacidade de fotossíntese das células e resulta em uma redução das variáveis supracitadas (ÖRDÖG et al., 2012).

Neste estudo, a densidade celular de *Picocystis salinarum* no meio f/2 apresentou notável variação entre os tratamentos de depleção de nitrogênio (0.5, 0.25 e 0.125 N), evidenciando uma correlação negativa entre densidade celular (cel.mL^{-1}) e concentração de nitrogênio (NaNO_3). Tal fato é corroborado com os resultados de cultivo da microalga *Chlorella zofingiensis* que obteve valor máximo de $1,8 \times 10^8 \text{ cel.mL}^{-1}$, mas sob -N só atingiu $0,53 \times 10^8 \text{ cel.mL}^{-1}$ (ZHU et al., 2014).

Não obstante, a depleção de nitrogênio (KNO_3) no meio J/1 não afetou significativamente a densidade celular de *P. salinarum*. Da mesma forma, Chen et al. (2011) não observaram diferenças significativas na densidade celular, quando a concentração de nitrogênio (KNO_3) foi de 1 ou 0,5 g.L^{-1} em cultivos da microalga halófila *Dunaliella tertiolecta*.

De acordo com os resultados da densidade celular de *P. salinarum* no meio f/2, era esperado que a taxa de crescimento (r) e as duplicações por dia (k) fossem diretamente proporcionais à concentração de nitrogênio, e o tempo de duplicação (T_2) fosse inversamente proporcional. Na microalga verde *Scenedesmus quadricauda*, encontraram-se essas mesmas relações mencionadas quando os parâmetros cinéticos de crescimento ($r= 0,33 \text{ d}^{-1}$, $k= 0,47 \text{ d}^{-1}$ e $T_2 = 2,09 \text{ d}$) foram observados sob presença de nitrogênio (+N), e variaram para valores de $r= 0,14 \text{ d}^{-1}$, $k= 0,20 \text{ d}^{-1}$ e $T_2= 4,93 \text{ d}$ em -N (ANAND; ARUMUGAM, 2015). Fato similar aconteceu em *C. vulgaris*, a taxa de crescimento foi diminuindo à medida que a concentração de nitrogênio também diminuía (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2010).

Essa tendência não foi observada em *P. salinarum* sob concentrações de depleção de nitrogênio (0.5, 0.25 e 0.125 N) no meio J/1. Ao contrário, nesses

tratamentos a r e k foram superiores do controle (1 N) e o T_2 maior no tratamento 0.5 N e em 1 N.

Em relação à massa seca de *P. salinarum* no meio f/2, essa variável respondeu proporcionalmente ao aumento da concentração de nitrogênio. Fato que corrobora com outros resultados como os de Sathasivam et al. (2018) que verificaram que o controle (1 g.L⁻¹ KNO₃) de cultivos de *D. salina* também mostraram relação do aumento de massa seca com o enriquecimento do meio por nitrogênio, comparado aos tratamentos com depleção (0,75, 0,5 e 0,25 g.L⁻¹ KNO₃). Ördög et al. (2012) também encontraram menor massa seca em *C. minutissima* sob depleção de nitrogênio (0,05 g.L⁻¹ KNO₃). Em *S. quadricauda*, o rendimento de massa seca aumentou de 0,06 g.L⁻¹ em -N para 1,39 g.L⁻¹ em +N (ANAND; ARUMUGAM, 2015). Porém, essa tendência não foi observada em *P. salinarum* cultivada no meio J/1, onde não houve variação significativa da massa seca nos tratamentos com depleção de nitrogênio.

Os resultados de crescimento (densidade celular, cinética de crescimento e massa seca) de *P. salinarum* sob as concentrações de depleção de nitrogênio testadas (37,5, 18,75 e 9,375 mg.L⁻¹ NaNO₃) no meio f/2, sustentam o fornecimento desse elemento em concentrações adequadas (75 mg.L⁻¹ NaNO₃) no meio de cultura para o correto metabolismo das microalgas. Diante do exposto, os resultados da depleção de nitrogênio no meio J/1 (500, 250, 125 mg.L⁻¹ KNO₃) em *P. salinarum* detalham que determinadas espécies de microalgas podem ter requerimentos nutricionais simples e não precisam de concentrações elevadas de nutrientes inorgânicos para seu crescimento e desenvolvimento. Esse fato explica porque os parâmetros de crescimento não variaram significativamente entre as concentrações de nitrogênio aplicadas. No cultivo de microalgas, é importante determinar as concentrações adequadas dos principais macronutrientes para estabelecer uma economia na formulação dos meios de cultura.

7.2 Efeito da depleção de nitrogênio na morfologia e estrutura celular

A limitação de nutrientes nas microalgas causa não apenas alterações no crescimento, mas também influencia na morfologia e estrutura celular (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). A variação entre o volume e a morfologia

da célula é tida como uma consequência proporcional ao suprimento de nitrogênio no meio (YOUNG; BEARDALL, 2003; SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012).

As células de *P. salinarum* em ambos os meios de cultura sempre estiveram compostas principalmente pelo morfotipo esférico, ao contrário do que foi visto no morfotipo trilobado, onde, no decorrer dos dias de cultivo sob a depleção de nitrogênio houve diminuição deste morfotipo. Possivelmente, isto seja uma estratégia de crescimento da espécie, que sob estresse nutricional deixa de gerar os dois lobos adicionais que exigem um maior gasto energético.

Da mesma forma, as células de *Chlamydomonas reinhardtii* com formato elipsoide (correspondendo à morfologia normal) foram gradualmente substituídas por formas celulares esféricas maiores na -N, produto da aparição de corpos lipídicos citosólicos que causaram o aumento do volume celular (DEAN et al., 2010; SIAUT et al., 2011; CAKMAK, 2012; MSANNE et al., 2012). A formação de corpos lipídicos e aumento no tamanho das células em condições de depleção ou -N também foi observada em outras microalgas verdes como *Acutodesmus dimorphus* (CHOKSHI et al., 2017), *Chlorella zofingiensis* (ZHU et al., 2014), *Coccomyxa* sp. (MSANNE et al., 2012), *Dunaliella tertiolecta* (CHEN et al., 2011; CAKMAK, 2019), *Nannochloropsis oceanica* (JIA et al., 2015), *Scenedesmus subspicatus* (DEAN et al. 2010) e *Tetraselmis* sp. (LIM et al., 2017).

Fenotipicamente, as células sob -N possuem aparência amarelada como resultado de uma redução acentuada no conteúdo de clorofila em comparação com aquelas que cresceram em +N (DEAN et al., 2010; SIAUT et al., 2011; CAKMAK, 2012; MSANNE et al., 2012). Fato que é corroborado em *P. salinarum* nos tratamentos de depleção do meio f/2 (Anexo 2).

A visualização das estruturas celulares (corpo lipídico e grão de amido) nos cultivos com depleção de nitrogênio em *P. salinarum* foram nitidamente identificadas na microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Nos meios de cultura utilizados observou-se que existe uma relação inversamente proporcional da concentração de nitrogênio e a formação de corpos lipídicos. Tais estruturas não foram identificadas no controle, porém, foram visualizadas em uma ou duas unidades por célula nos tratamentos 0.5 e 0.25 N, chegando a ser a organela mais

proeminente no tratamento com maior depleção (0.125 N), favorecendo o aumento do volume celular.

O corpo lipídico é a principal estrutura de armazenamento de lipídios neutros nas células eucarióticas, e evidências crescentes mostram seu envolvimento em outros processos celulares como homeostase lipídica e sinalização de comunicações entre outras organelas. Os corpos lipídicos surgem em resposta a necessidades celulares específicas e o seu número por célula varia dependendo do estágio de desenvolvimento e condições de crescimento (GOOLD et al., 2014). É proposto que os lipídeos são sintetizados e empacotados inicialmente no plastídio e depois transportados para o citoplasma, no qual formam o corpo lipídico (ELTGROTH; WATWOOD; WOLFE, 2005).

Um grande acúmulo de gotículas lipídicas pode ser desencadeado pela ausência de nutrientes (N, Fe, S, P), alta luminosidade, hipóxia ou aumento da salinidade. Entre os vários fatores mencionados, o melhor estudado é a resposta da -N, onde o corpo lipídico funciona como fonte de armazenamento de carbono sob condições adversas, visando a formação de um reservatório rico em energia quando as condições ideais de crescimento se restabelecerem (RODOLFI et al. 2009; GOOLD et al., 2014; ROOPNARAIN; GRAY; SYM, 2014).

Tanto o número quanto o tamanho dos corpos lipídicos podem aumentar à medida que o estresse se prolonga, o processo é acompanhado pela degradação dos lipídios da membrana e a desorganização ou ruptura da grana do tilacoide (SIAUT et al., 2011; GOOLD et al., 2014; ROOPNARAIN; GRAY; SYM, 2014). Como constatado no presente estudo, onde as células sob depleção de nitrogênio no meio f/2 não foi observada a presença do cloroplasto, e no meio J/1 onde essa organela mostrou volume reduzido.

Da mesma forma, em *Chlamydomonas reinhardtii* um único plastídio em formato de taça ocupou mais de dois terços do volume celular total quando cultivado em +N, onde nem grãos de amido e corpos lipídicos foram detectados. A aparição e acúmulo dessas organelas, bem como a redução das membranas plastidiais foram marcantes nas células sob -N (SIAUT et al., 2011).

Quanto a presença de grãos de amido foi elevada nas células de *P. salinarum* no tratamento 0.5 N no meio f/2. Já nos outros tratamentos com depleção (0.25 e 0.125 N) o conteúdo diminuiu até não ser observável. No meio J/1, foram observados numerosos grãos de amido contidos em um cloroplasto parietal em forma de taça (0.25 N), mas no tratamento 0.125 N o cloroplasto foi reduzido e os grãos de amido diminuíram.

Os carboidratos estão armazenados nos cloroplastos na forma de grãos de amido e é a principal forma de reserva energética da maioria das microalgas verdes. Zhu et al. (2014) observaram em *Chlorella zofingiensis* aumento dos grãos de amido tanto em tamanho como abundância após os primeiros dias sob -N, enquanto os corpos lipídicos não se alteraram. No 6º dia de cultivo, as células aumentaram de tamanho devido a presença de corpos lipídicos no lugar de grânulos de amido; além disso, a fusão de pequenos corpos lipídicos foi observada para formar outros maiores.

Ito et al. (2013) informaram que em condições de -N, os grânulos de amido podem se fundir, e Mizuno et al. (2013) sugerem que o amido é convertido em lipídeo sob -N. Esta observação sugere que o fluxo de carbono do amido deve fornecer uma parte dos precursores necessários para a síntese lipídica. Essas informações confirmam a presença de um único e grande corpo lipídico nas células de *P. salinarum* sob a máxima depleção testada (0.125 N), pode ser produto do armazenamento de lipídios que provavelmente tornou-se maior ao utilizar a fonte de carbono proveniente dos grãos de amido ao longo do período do cultivo.

7.3 Efeito da depleção de nitrogênio nos pigmentos fotossintéticos

Como a clorofila é um composto de nitrogênio facilmente acessível, ela pode ser usada como reserva de nitrogênio intracelular para dar continuidade ao crescimento e desenvolvimento das microalgas. Em casos em que o nitrogênio venha a ser escasso ou esgotado (LI et al., 2008), poderá ocorrer perda progressiva de certas funções plásticas, tal como, a diminuição da síntese de clorofila em aumento de outros pigmentos como os carotenoides (MSANNE et al., 2012).

No presente estudo, a depleção de nitrogênio afetou negativamente o teor de clorofila *a* e *b* de *P. salinarum* no meio f/2. No controle, a clorofila *a* tornou-se abundante em todos os tratamentos a partir do 12º dia, chegando a demonstrar

uma redução substancial em relação ao tratamento com a maior depleção de nitrogênio (0.125 N) no último dia de análise, quando o teor de clorofila caiu para 91,2%. Situação semelhante ocorreu para o teor de clorofila *b*, onde esta foi maior a partir do 16º dia. Em consequência, a maior diferença também foi encontrada entre o controle e o tratamento 0.125 N, reduzindo para 84% deste pigmento. Ao contrário, no meio J/1 a depleção de nitrogênio não afetou a concentração de clorofila *a* (a partir do 16º dia) e clorofila *b* (a partir do 8º dia).

Pancha et al. (2014) aplicaram um gradiente de nitrato (NaNO_3) variando de 0 a 247 mg.mL^{-1} no meio de cultura para *Scenedesmus* sp. Constataram que o teor da clorofila *a* e *b* atingiu $1,89$ e $0,87 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (-N) comparado a $7,03$ e $4,20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (+N), respectivamente. As concentrações de clorofila *a* e *b* em *Chlorella minutissima* sob depleção de nitrogênio ($7 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KNO}_3$) foram significativamente menores em comparação ao controle ($700 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KNO}_3$) (ÖRDÖG et al., 2012). A espécie *Chlorella zofingiensis* mostrou uma forte degradação da clorofila sob -N em apenas um dia de cultivo (ZHU et al., 2014). Em cultivos de *Dunaliella salina*, o teor de clorofila *a* foi maior no controle ($1 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$) seguido dos tratamentos com depleção $0,75$, $0,25$ e $0,50 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, respectivamente (SATHASIVAM et al., 2018).

Em relação aos carotenoides, a depleção de nitrogênio no meio f/2 afetou positivamente a concentração em *P. salinarum*, onde o tratamento com maior depleção de nitrogênio (0.125 N) obteve-se maiores valores a partir do 12º dia, registrando seu aumento máximo no 20º dia, quando o valor de carotenoides foi sete vezes maior comparado ao controle. O contrário foi observado no meio J/1, quando todos os tratamentos com depleção de nitrogênio (a partir do 12º até o final do cultivo) não mostraram diferença significativa na sua concentração.

O teor de carotenoides ($160,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) em *Dunaliella salina* sob depleção de nitrogênio ($0,25 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$) apresentou maiores concentrações quando comparado com outros tratamentos ($0,5$, $0,75$ e $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$), bem como o teor mínimo ($99,43 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi notado no tratamento com maior concentração de nitrogênio ($1 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$) (SATHASIVAM et al., 2018). De forma semelhante, o teor de clorofila diminuiu e o teor de carotenoides aumentou rapidamente sob -N nas microalgas

marinhas *Chlamydomonas reinhardtii* (CAKMAK et al., 2012) e *Dunaliella tertiolecta* (YOUNG; BEARDALL, 2003).

A persistência ou o aumento de carotenoides em relação à clorofila durante a depleção do nitrogênio pode refletir os custos diferenciais do nitrogênio na produção desses pigmentos. Essa ocorrência pode estar relacionada à reorganização do aparato fotossintético para maximizar a eficiência de absorção de espectros específicos de luz sob situações de estresse nutricional (YOUNG; BEARDALL, 2003). A depleção ou a -N nas microalgas verdes provoca a diminuição na clorofila *a* e *b*, e aumento nos carotenoides; este fato é observável pela mudança na cor do cultivo de verde para amarelo durante o período de crescimento, como foi anteriormente descrito.

7.4 Efeito da depleção de nitrogênio nas proteínas, carboidratos e lipídeos

Sendo o nitrogênio o elemento essencial na participação da síntese proteica, a deficiência deste diminuirá drasticamente sua biossíntese, afetando muitas funções celulares como inibição do ciclo do ácido cítrico, deterioração da fotossíntese e diminuição drástica da divisão celular devido às insuficientes proteínas do centro reacional do fotossistema e do transporte fotossintético de elétrons. Em situação de -N, vias metabólicas alternativas para a fixação de carbono inorgânico, como a síntese de carboidratos ou lipídeos, são ativadas (DENG; FEI; LI, 2011; MSANNE et al., 2012; PANCHA et al., 2014).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a diminuição da concentração do nitrogênio no meio f/2 (de 75 a 9,375 mg.L⁻¹ NaNO₃) resultou em diminuição no teor de proteínas, observando uma redução de até 78,5% em relação ao controle e a máxima depleção testada (1 e 0.125 N). A depleção do nitrogênio no meio J/1 (de 1000 a 125 mg.L⁻¹ KNO₃) não afetou a concentração de proteínas, possivelmente porque embora houvesse decréscimo na concentração de nitrato nos tratamentos, ainda eram significativamente elevadas em relação às concentrações de nitrogênio testadas no meio f/2 onde sim foi significativa a depleção do nitrogênio.

A concentração de proteínas na microalga marinha *Chlamydomonas reinhardtii*, diminuiu em 18% em resposta à -N (DEAN et al., 2010), podendo diminuir drasticamente para 74% – 82% (CAKMAK et al., 2012; MSANNE et al.,

2012). Em *Nannochloropsis oceanica*, a -N causou redução de até três vezes (de 38% para 9,5%) (JIA et al., 2015). Nas microalgas continentais nativas *Acutodesmus obliquus*, *Ankistrodesmus* sp. e *Chlorella lewinii* o teor de proteínas em +N reduziram de 12,8% para 9,7%, de 14,5% para 10,5% e de 31,2% para 14,2%, respectivamente sob -N (COBOS et al., 2017).

A produção de carboidratos tem dois propósitos principais nas microalgas: componentes estruturais de parede celular e reserva (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Na ausência de nitrogênio, o carbono gerado pela fotossíntese pode entrar na síntese de moléculas de armazenamento como o amido (carboidratos) e/ou corpos oleosos (lipídios) (MSANNE et al., 2012).

O teor de carboidratos constituiu a maior fração das biomoléculas de *P. salinarum* nos meios mais enriquecidos de nitrogênio (1 e 0.5 N) do meio f/2. Seu conteúdo foi afetado negativamente pela depleção de nitrogênio apenas nos tratamentos 0.25 e 0.125 N, até deixar de ser a principal biomolécula no tratamento com maior depleção. Essa tendência não foi encontrada no meio J/1, onde os resultados indicam que a diminuição do fornecimento do nitrogênio aumenta o teor de carboidratos.

Estudos relacionados ao acúmulo de carboidratos em cultivos com -N relatam que em *Chlorella vulgaris* essa biomolécula representou 41% da biomassa total (DRAGONE et al., 2011), 35% em *T. subcordiformis* (JI et al., 2011; YAO et al., 2012) e 57% na microalga nativa *Desmodesmus* sp. (RIZZA et al., 2017). Cobos et al. (2017) também encontraram aumento no teor de carboidratos sob -N, de 44,3% para 49,6% em *Acutodesmus obliquus*, de 30,3% para 34,6% em *Ankistrodesmus* sp. e em *Chlorella lewinii* de 24,6% para 48,3%. Em certas espécies; como *Chlamydomonas reinhardtii*, o aumento no nível de carboidratos pode ser rápido e imediato, podendo alcançar até 80% (SIAUT et al., 2011; CAKMAK et al., 2012; MSANNE et al., 2012).

Sob +N, os lipídios têm função principalmente estrutural das membranas (ÖRDÖG et al., 2012). Em geral, sob limitação nutricional, o fluxo de carbono fotossintético muda de maneiras diferentes para canalizar a energia metabólica em vários compostos ricos em energia, como os lipídios, em detrimento de uma taxa

de crescimento reduzida (SIAUT et al., 2011; JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013).

Os lipídeos são produtos de armazenamento preferidos pelas microalgas sob várias condições de estresse, porque são de natureza hidrófoba, têm estados muito reduzidos, são empacotados eficientemente na célula e podem ser utilizados nestas condições adversas para a sua sobrevivência e posterior proliferação celular (COURCHESNE et al., 2009). Como já foi mencionado, sob depleção ou -N os lipídeos são armazenados em forma de corpo lipídico; o qual pode atingir a ser a organela mais proeminente na célula, fazendo das microalgas um dos recursos biológicos promissores para a produção de biocombustíveis (MSANNE et al., 2012; CHOKSHI et al., 2017).

A depleção de nitrogênio em ambos os meios de cultura causou aumento no teor de lipídios de *P. salinarum*. No meio f/2, o aumento chegou a 59,4% (0,125 N) em relação ao controle (1 N), tornando os lipídeos a principal biomolécula. No meio J/1, o aumento foi de 30,4% (0,125 N) mas não chegou a ser a biomolécula mais representativa. Estes resultados sugerem que, dependendo da concentração e do tipo de nitrato fornecido, *P. salinarum* sintetiza uma determinada biomolécula para enfrentar à depleção de nitrogênio e continuar com o seu desenvolvimento.

A depleção de nitrogênio (diminuição de 75% do nitrato no meio de cultura) em *Nannochloropsis oceanica* aumentou os teores de lipídios de 7,9% para 15,31%, e em *Chlorella vulgaris* de 5,9 para 16,41% (CONVERTI et al., 2009). A -N incrementou o teor lipídico em três cepas de *Chlorella*, constatando que *C. emersonii*, *C. minutissima* e *C. vulgaris* mostraram aumento de lipídios na ordem de 63%, 56% e 40% do seu teor de biomoléculas, respectivamente (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000). Ördög et al. (2012) também constataram altos teores lipídicos (40% e 46%) em duas cepas de *C. minutissima* sob -N.

Entretanto, em *Chlorella lewinii* ocorreu aumento do teor lipídico de 9,5% para 13,2%, *Acutodesmus obliquus* de 15,2% para 18,8% e *Ankistrodesmus* sp. de 23,7% a 39,5% (COBOS et al., 2017). Na diatomácea *Chaetoceros muelleri* e na clorofícea *D. salina* o teor de lipídeos alcançaram valores de 46% e 54%, respectivamente, em -N (GAO; YANG; WANG, 2013).

7.5 Efeito da depleção de nitrogênio no perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)

As microalgas cultivadas em +N geralmente têm em sua constituição de FAME principalmente os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), indicando o envolvimento dos ácidos graxos nos componentes da membrana. Como demonstrado na microalga continental *Chlorella zofingiensis* (ZHU et al., 2014) e na microalga marinha *Chlamydomonas reinhardtii* (MSANNE et al., 2012), nesses microorganismos, a membrana é principalmente constituída por ácido palmitidônico (C16:4) e ácido linolênico (C18:3).

Em contraste, a depleção ou -N estimula a produção de ácidos graxos saturados (SFA) como o ácido palmítico (C16:0) e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) como o ácido oleico (C18:1). Como constatado nas microalgas verdes *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oculata*, fazendo desses organismos potentes alternativas para o biodiesel (CONVERTI et al., 2009). Resultado semelhante registrou-se na diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (YODSUWAN; SAWAYAMA; SIRISANSANEEYAKUL, 2017) e nas microalgas marinhas *Chlamydomonas reinhardtii* (MSANNE et al., 2012), *D. salina* (LV et al., 2016), *D. tertiolecta* (CHEN et al. 2011) e *Tetraselmis* sp. (LIM et al., 2017).

A diminuição de PUFA; principalmente ácido linolênico (C18:3), também é uma característica da -N (LIM et al., 2017). A biomassa de *Coccomyxa* sp. em +N era abundante em ácidos pertencentes a PUFA, em particular linoleico e linolênico, ao contrário, sob -N mostrou aumento no ácido oleico (MUFA) (MSANNE et al., 2012). Alguns FAME são sintetizados exclusivamente em +N, como ácido esteárico (C18:0), eicosadienoico (C20:2) e araquidônico (C20:4). Enquanto outros não são encontrados sob -N, como o ácido oleico (C18:1), observado em *D. salina* (LV et al., 2016).

No presente estudo, a depleção de nitrogênio influenciou positivamente a concentração dos SFA com destaque ao aumento do ácido palmítico em *P. salinarum* em todos os tratamentos no meio f/2, alcançando máximo valor em 0.5 N e em 0.5 N no meio J/1. Já a presença do ácido linolênico (PUFA) em ambos os meios de cultura foi mínima ou nem quantificada pela sua baixa concentração. Diante do exposto, confirma-se que as células das microalgas tendem a diminuir o

grau de insaturação dos ácidos graxos em resposta ao déficit de nitrogênio (ZHU et al., 2014). Embora em algumas microalgas o oposto tenha sido observado, em *S. quadricauda* o principal componente foi o ácido oleico sob +N e foi substancialmente reduzido sob -N (ANAND; ARUMUGAM, 2015).

7.6 Potencial uso da biomassa de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel

Nos últimos anos, a produção de biodiesel atraiu a atenção mundial devido à consciência no esgotamento dos combustíveis fósseis, sendo o biodiesel a partir da biomassa de microalgas uma alternativa promissora (CHEN et al., 2018).

As dificuldades na produção de biodiesel a partir das microalgas não estão na tecnologia de extração dos ácidos graxos, mas sim em identificar uma cepa com alto conteúdo dessa biomolécula e uma rápida taxa de crescimento (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). O perfil de FAME tem papel importante na qualidade do biodiesel, uma vez que determina a viscosidade, lubricidade, insaturação total (valor de iodo), densidade, estabilidade oxidativa, índice de cetano (indicador de qualidade de ignição), propriedade de fluxo a frio e valor calorífico (CHISTI, 2007; FRANCISCO et al., 2010; CHEN et al., 2018).

Os FAME das microalgas diferem das plantas superiores por serem muito ricos em PUFA com quatro ou mais ligações duplas, que são mais suscetíveis à oxidação durante o armazenamento, e isso reduz sua aceitabilidade para uso em biodiesel (CHISTI, 2007; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Porém, alguns lipídeos vegetais potenciais para o biodiesel também enfrentam esse problema, como o óleo de canola que possui alto teor de ácido oleico (MUFA) e contém grandes quantidades de ácido linoleico e linolênico (PUFA).

Quando a concentração de PUFA é alta, a taxa de emissão de nitratos e nitritos do biodiesel aumenta. Por outro lado, quando os SFA são elevados resultam em menor índice de cetano e aumenta a estabilidade do biodiesel produzido, já que os SFA são mais resistentes à auto-oxidação. Portanto, espera-se que o nível de saturação de lipídios seja alto para seu uso na produção de biocombustíveis (KNOTHE, 2005; SHARMA et al., 2012).

No presente estudo, os resultados mostraram que a depleção de nitrogênio influenciou no FAME de *P. salinarum*. A diminuição no teor total de PUFA resultou no teor reduzido de ácido linolênico nos tratamentos 0.5 e 0.125 N no meio f/2, e da diminuição do ácido linoleico em todos os tratamentos de depleção no meio J/1. No meio f/2, o FAME revelou aumento na composição de SFA em todos os tratamentos de depleção, mas, os MUFA foram só acrescentados no tratamento 0.25 N. No meio J/1, os SFA aumentaram só no tratamento 0.5 N e pelo contrário o MUFA aumentou só nos tratamentos 0.25 e 0.125 N.

De acordo com os requisitos das Normas Europeias EN 14213 e EN 14214 que limitam o teor do ácido linolênico a concentrações mínimas no biodiesel (inferior a 12% do total do FAME) para uso em veículos automotores (KNOTHE, 2006; CHISTI, 2007), os FAME de *P. salinarum* possuem características apropriadas para uso como matéria-prima na produção de biodiesel.

O biodiesel composto de uma mistura com alta porcentagem de SFA e MUFA, como foi encontrado no tratamento 0.5 N em ambos os meios de cultura, é ideal por oferecer maior rendimento energético, estabilidade oxidativa superior e maior índice de cetano, mas, é propenso a solidificar a baixa temperatura (KNOTHE, 2006). Por outro lado, um biodiesel com altos níveis de PUFA pode reduzir essas características e afetar negativamente à estabilidade oxidativa, uma vez que as taxas de oxidação de C18:2 e C18:3 são maiores quando comparadas às de C18:1.

Desta forma, os FAME da microalga *P. salinarum*, principalmente nos tratamentos 0.5 N em ambos os meios de cultura, por apresentar elevados rendimentos de lipídeos e adequada composição de ácidos graxos, demonstra capacidade potencial como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.

7.7 Considerações finais sobre a depleção de nitrogênio

A análise de componentes principais (PCA) permitiu obter um panorama geral dos acontecimentos dos efeitos da depleção de nitrogênio no crescimento, morfologia e composição bioquímica de *P. salinarum*. O cultivo desta microalga nativa em ambos os meios de cultura (1 N) possui características esperadas nas microalgas verdes, como o seu crescimento acompanhado de altos conteúdos de clorofila *a* e *b*, e teores elevados de proteínas e particularmente nesta espécie a presença do morfotipo trilobado (Fig. 15, 16).

No meio f/2, as máximas depleções (0.25 e 0.125 N) estimularam a forma esférica das células tornam-se maioritariamente esféricas, inibição da massa seca, da taxa de crescimento e das duplicações por dia, porém, tempo de duplicação prolongado. A biomassa de microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídios. Sabendo-se que para constituir matéria-prima de biodiesel, esta deve ser rica em ácidos graxos, uma microalga com um teor de proteínas muito alto e baixo teor de lipídios não seria útil como matéria-prima para biocombustíveis.

A presença de altos teores de carotenoides, lipídeos e ácido graxo oleico de *P. salinarum* sob depleção de nitrogênio pela metade (0.5 N), foi acompanhada de ácidos graxos mirístico e palmítico. Da mesma forma nas máximas depleções (0.25 e 0.125 N) no meio J/1, a morfologia esférica foi característica e acompanhada de altos teores de lipídeos. Mas, o teor de carboidratos também foi maior nestes tratamentos e associada à presença dos ácidos láurico e oleico, enquanto o tratamento 0.5 N dominou o conteúdo dos ácidos palmítico e mirístico.

As diferenças encontradas na constituição bioquímica de *P. salinarum* em ambos os meios de cultura, evidenciam a importância do aporte essencial do nitrogênio, tanto em sua forma como em sua proporção no meio de cultura. Conforme documentado no presente trabalho, a depleção ou a -N em culturas de microalgas constitui eficiente estratégia para estimular a síntese de lipídeos e de ácidos graxos, fazendo da sua biomassa uma fonte alternativa de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Assim como na depleção de macronutrientes como o nitrogênio, o cultivo de certas espécies de microalgas em meios de cultura sob depleção ou privação de outros elementos como o enxofre, também pode causar considerável acúmulo de lipídeos (CAKMAK, 2012; YAO et al., 2012). Porém, isso deve ser estudado aprofundadamente, pois há poucas espécies que têm uma relação direta entre a produtividade lipídica e o déficit de um micronutriente.

Outra alternativa na promoção de biomassa está no uso de fitohormônios, esta poderia ser uma estratégia promissora no cultivo de microalgas para melhorar o potencial de produção de lipídeos sem uma perda substancial de biomassa para a geração de biocombustíveis (BABU et al., 2017; RENUKA et al., 2018; YU et al.,

2018). Há ainda a possibilidade de estimular a produção de biomassa em meio enriquecido de nitrogênio seguido de transferência das células a um meio deficiente de nitrogênio, promovendo assim a produção de ácidos graxos (SAN PEDRO et al., 2013).

De qualquer modo, são procedimentos custosos que acabam onerando a produção de biomassa em larga escala. Por enquanto, o cultivo de microalgas em meios de cultura com depleção ou -N continua sendo a estratégia mais eficaz e econômica para a produção de lipídeos e ácidos graxos potenciais na produção de biodiesel. Não se esquecendo da necessidade de buscar por cepas capazes de manter o crescimento ótimo sob condições de depleção de nitrogênio, e que ao mesmo tempo, produzam ácidos graxos de alta qualidade.

8. CONCLUSÕES

- O cultivo de *P. salinarum* sob depleção de nitrogênio corrobora a importância de estabelecer a concentração dos principais macronutrientes para obter elevado teor de uma determinada biomolécula.

- A densidade celular, cinética de crescimento e massa seca de *Picocystis salinarum* apresentaram máximos valores no controle (1 N) do meio f/2. Em relação ao meio J/1, a depleção não causou diferenças em relação ao controle.

- A depleção de nitrogênio promoveu a formação de corpos lipídicos e grãos de amido como organelas de reserva. Na maior depleção de nitrogênio no meio f/2, os corpos lipídicos apareceram de forma marcante, enquanto no meio J/1 a presença de corpos lipídicos e grãos de amido aconteceram em conjunto.

- O conteúdo de pigmentos fotossintéticos também foi influenciado pela depleção de nitrogênio. No meio f/2, o teor de clorofila *a* e *b* diminuiu e os carotenoides aumentaram. A depleção de nitrogênio no meio J/1 não influenciou no teor desses pigmentos.

- No meio f/2, o teor de proteínas e carboidratos foram afetados pela depleção de nitrogênio. Já, o teor de lipídeos foi estimulado, chegando a ser a biomolécula predominante em 0.125 N. No meio J/1, a depleção de nitrogênio promoveu tanto o teor de lipídeos como dos carboidratos que apareceram como as biomoléculas mais representativas em todos os tratamentos (0.5, 0.25, 0.125 N).

- No tratamento 0.5 N, em ambos os meios de cultura, os ácidos graxos saturados (SFA) foram os mais representativos entre os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), devido ao aumento do ácido palmítico. Principalmente, pela concentração elevada dos SFA e baixo nível dos PUFA, o FAME de *P. salinarum* no tratamento 0.5 N de ambos os meios de cultura mostrou-se ideal para uso na indústria como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.

- A relação entre a concentração de nitrogênio e as mudanças morfológicas, estruturais e composição bioquímica da espécie nativa halófila *P. salinarum* em cultivo é inédito na literatura, não havendo outros registros para microscopia eletrônica de transmissão, valores de proteínas, carboidratos e lipídeos totais, assim como a descrição do seu perfil de ácidos graxos nos tratamentos empregados.

9. REFERÊNCIAS

- ANAND, J.; ARUMUGAM, M. Enhanced lipid accumulation and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 190–194, 2015.
- BABU, A.G.; WU, X.; KABRA, A.N.; KIM, D.P. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. **Algal Research**, v. 23, p. 178–185, 2017.
- BEN ALI, R.; BEN OUADA, S.; CHOUCHE, L.; MESSAOUDI, I.; BEN OUADA, H.; OTHMANE, A. Cadmium effect on physiological responses of the tolerant Chlorophyta specie *Picocystis* sp. isolated from Tunisian wastewaters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 1803–1810, 2017.
- BEN OUADA, S.; BEN ALI, R.; LÉBOULANGER, C.; ZAGHDEN, H.; CHOURA, S.; BEN OUADA, H.; SAYADI, S. Effect and removal of bisphenol A by two extremophilic microalgal strains (Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1765–1776, 2018.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BOROWITSKA, M.A. Algal growth media and sources of algal cultures. *In*: BOROWITSKA, M.A.; BOROWITSKA, L.J. (Eds.). **Micro-algal Biotechnology**. New York: Cambridge University Press, p. 456–465, 1988.
- CAKMAK, T.; ANGUN, P.; DEMIRAY, Y.E.; OZKAN, A.D.; ELIBOL, Z.; TEKINAY, T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1947–1957, 2012.
- CAKMAK, Z.E. Ammonium nutrition induces triacylglycerol, β -carotene, and lutein production in *Dunaliella tertiolecta* Butcher. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n. 4, p. 331–342, 2019.
- CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R.D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R.Y. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336–346, 2018.
- CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T.C.; NG, K.Y.S.; SALLEY, S.O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649–1655, 2011.

CHIA, A.M.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G.; PARRISH, C.C. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 48, n. 1, p. 1-11, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 60, p. 1–12, 2017.

COBOS, M.; PAREDES, J.D.; MADDOX, J.D.; VARGAS-ARANA, G.; FLORES, L.; AGUILAR, C.P.; MARAPARA, J.L.; CASTRO, J.C. Isolation and characterization of native microalgae from the Peruvian Amazon with potential for biodiesel production. **Energies**, v. 10, n. 224, p. 1–16, 2017.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 1146–1151, 2009.

COURCHESNE, N.M.D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN, C.Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, n. 1 – 2, p. 31–41, 2009.

DEAN, A.P.; SIGEE, D.C.; ESTRADA, B.; PITTMAN, J.K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4499–4507, 2010.

DELGADO, R.T.; TERREROS, H.M.; ASTOCONDOR, M.M.; HUATUCO, E.M. *Picocystis salinarum* (Prasinophyceae, Chlorophyta) en las Salinas de Chilca, Lima, primer registro para el Perú. **Arnaldoa**, v. 24, n. 2, p. 557-566, 2017.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M.F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 1, p. 163 -170, 2011.

DENG, X.; FEI, X.; LI, Y. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 260–270, 2011.

DOS SANTOS, A.L.; POLLINA, T., GOURVIL, P.; CORRE, E.; MARIE, D.; GARRIDO, J.L.; RODRÍGUEZ, F.; NOËL, M.H.; VAULOT, D.; EIKREM, W. 2017. Chloropicophyceae, a new class of picophytoplanktonic prasinophytes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 14019, p. 1-20, 2017.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B.D.; ABREU, A.P.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011.

DUONG, V.T.; LI, Y.; NOWAK, E.; SCHENK, P.M. Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. **Energies**, v. 5, p. 1835–1849, 2012.

ELTGROTH, M.L.; WATWOOD, R.L.; WOLFE, G.V. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliana huxleyi*. **Journal of Phycology**, v. 41, p. 1000–1009, 2005.

FRANCISCO, E.C.; NEVES, D.B.; JACOB-LOPES, E., FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 395-403, 2010.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484–491, 2013.

GOOLD, H.; BEISSON, F.; PELTIER, G.; LI-BEISSON, Y. Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 4, p. 545–555, 2014.

GROBBELAAR, J.U. The microalgal cell with reference to mass cultures. Inorganic algal nutrition. *In*: RICHMOND, A.; HU, Q. (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 123-133, 2013.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: SMITH, W.L.; CHARLEY, M. H. (Eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, p. 29–60, 1975.

GUILLOU, L.; EIKREM, W.; CHRÉTIENNOT-DINET, M.J.; LE GALL, F.; MASSANA, R.; ROMARI, K.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; VAULOT, D. Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. **Protist**, v. 155, n. 2, p. 193–214, 2004.

HEPPERLE, D.; KRIENITZ, L.; HOLLIBAUGH, T. International Phycological Congress N°7. Molecular phylogeny of picoplanktonic chlorophytes and the discovery of a new evolutionary lineage. **Phycologia**, v. 40, n. 4, p. 1-125, 2001.

ILLMAN, A.M.; SCRAGG, A.H.; SHALES, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 631–635, 2000.

JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae, and natural phytoplankton. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 167, n. 2, p. 191-194, 1975.

JI, C.F.; YU, X.J.; CHEN, Z.A.; XUE, S.; LEGRAND, J.; ZHANG, W. Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 10, p. 5817–5821, 2011.

JIA, J.; HAN, D.; GERKEN, H.G.; LI, Y.; SOMMERFELD, M.; HU, Q.; XU, J. Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. **Algal Research**, v. 7, p. 66–77, 2015.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.M.; MURTHY, G.S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, n. 9, p. 4607–4638, 2013.

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

KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 10, p. 823–833, 2006.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by phenol–sulfuric acid method. *In*: HELLEBUST, J.A., CRAIGIE, J.S. (Eds.). **Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods**. London: Cambridge University Press, p. 95–97, 1978.

KRIENITZ, L.; BOCK, C.; KOTUT, K.; LUO, W. *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) in saline lakes and hot springs of East Africa. **Phycologia**, v. 51, n. 1, p. 22-32, 2012.

LEWIN, R.A.; KRIENITZ, L.; GOERICKE, R.; TAKEDA, H.; HEPPELLE, D. *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) - a new picoplanktonic green alga. **Phycologia**, v. 39, p. 560–565, 2000.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C.Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629–636, 2008.

LIM, D.K.Y.; SCHUHMANN, H.; THOMAS-HALL, S.R.; CHAN, K.C.K.; WASS, T.J.; AGUILERA, F.; ADARME-VEGA, T.C.; DAL'MOLIN, C.G.O.; THORPE, G.J.; BATLEY, J.; EDWARDS, D.; SCHENK, P.M. RNA-Seq and metabolic flux analysis of *Tetraselmis* sp. M8 during nitrogen starvation reveals a two-stage lipid accumulation mechanism. **Bioresource Technology**, n. 244, p. 1281–1293, 2017.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LV, H.; CUI, X.; WANG, S.; JIA, S. Metabolic profiling of *Dunaliella salina* shifting cultivation conditions to nitrogen deprivation. **Metabolomics**, v. 6, n. 170, p. 1-9, 2016.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, 631–645, 2012.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLEAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217 – 232, 2010.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.M.F.; FILHO, N.R.A.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

MIZUNO, Y., SATO, A., WATANABE, K., HIRATA, A., TAKESHITA, T., OTA, S., SATO, N.; ZACHLEDER, V.; TSUZUKI, M.; KAWANO, S. Sequential accumulation

of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 150–155, 2013.

MSANNE, J.; XU, D.; KONDA, A.R.; CASAS-MOLLANO, J.A.; AWADA, T.; CAHOON, E.B.; CERUTTI, H. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Phytochemistry**, v. 75, p. 50–59, 2012.

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K.A.; DASTIDAR, M.G. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Processing Technology**, v. 120, p. 79–88, 2014.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W.A.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J.; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 907–914, 2012.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.

RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

REN, H.Y.; LIU, B.F.; MA, C.; ZHAO, L.; REN, N.Q. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n. 143, p. 1-10, 2013.

RENUKA, N.; GULDHE, A.; SINGH, P.; BUX, F. Combined effect of exogenous phytohormones on biomass and lipid production in *Acutodesmus obliquus* under nitrogen limitation. **Energy Conversion and Management**, n. 168, p. 522–528, 2018.

REYNOLDS, C.S. **Ecology of phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

RIZZA, L.S.; SMACHETTI, M.E.S.; DO NASCIMENTO, M.; SALERNO, G.L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017.

RODOLFI, L.; ZITTELA, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M.R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–12, 2009.

ROOPNARAIN, A.; GRAY, V.M.; SYM, S. Influence of nitrogen stress on *Isochrysis galbana* strain U4, a candidate for biodiesel production. **Phycological Research**, v. 62, n. 4, p. 237–249, 2014.

SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.V.; ACIÉN, F.G.; MOLINA-GRIMA, E. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 353–361, 2013.

SATHASIVAM, R.; PONGPADUNG, P.; PRAIBOON, J.; CHIRAPART, A.; TRAKULNALEAMSAI, S.; ROYTRAKUL, S.; JUNTAWONG, N. Optimizing NaCl and KNO₃ concentrations for high β-carotene production in photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 isolated from saline soil sample. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 45, n. 1, p. 106–115, 2018.

SHARMA, K.K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P.M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v. 5, n. 5, p. 1532–1553, 2012.

SHUBA, E.S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, n. 1, p. 743–755, 2018.

SIAUT, M.; CUINÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2011.

SPOEHR, H. A.; MILNER, H.W. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. **Plant Physiology**, v. 24, n.1, p. 120-149, 1949.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, n. 1-2, p. 31-43, 1969.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. A practical handbook of seawater analysis. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 167, p. 1-311, 1968.

TAN, X.B.; LAM, M.K.; UEMURA, Y.; LIM, J.W.; WONG, C.Y.; LEE, K.T. Cultivation

of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 17–30, 2018

TANDON, P.; JIN, Q. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 1089-1099, 2017.

VONSHAK, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. *In*: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC Press, p. 117–145, 1986.

WANG, S.; LAMBERT, W.; GIANG, S.; GOERICKE, R.; PALENIK, B. Microalgal assemblages in a poikilohaline pond. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 303–309, 2014.

WOOD, A.M.; EVERROAD, R.C.; WINGARD, L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures. *In*: ANDERSEN, R.A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. San Diego: Elsevier, Academic Press, p. 269-286, 2005.

YAO, C.; AI, J.; CAO, X.; XUE, S.; ZHANG, W. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 438–444, 2012.

YODSUWAN, N.; SAWAYAMA, S.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, p. 190-197, 2017.

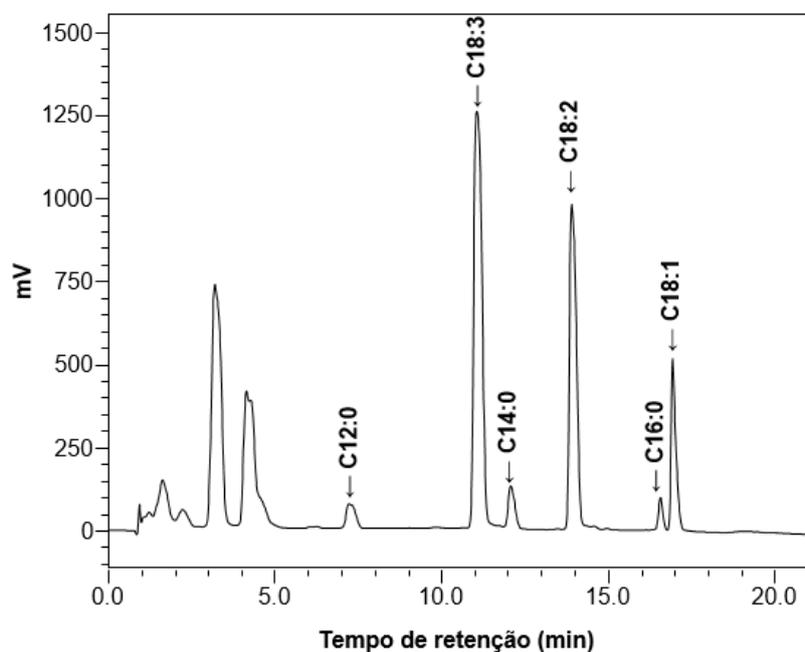
YOUNG, E.B.; BEARDALL, J. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 5, p. 897–905, 2003.

YU, Z.; PEI, H.; JIANG, L.; HOU, Q.; NIE, C.; ZHANG, L. Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae. **Bioresource Technology**, n. 247, p. 904–914, 2018.

ZHU, S.; HUANG, W.; XU, J.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 292–298, 2014.

ANEXOS

Anexo 1. Perfil cromatográfico da solução com os ésteres padrão.



Anexo 2. Aspecto da coloração dos cultivos de *Picocystis salinarum* nos meios de cultura f/2 e J/1 com concentrações de depleção de nitrogênio ao dia 20.

