UFBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

MARIA ISABEL FUENTES PARRA

Efeito da irradiância e disponibilidade de nitrogênio no crescimento, teor de clorofila, perfil de glicerídeos totais e potencial antioxidante de *Desmodesmus* sp.

PEI
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial

SALVADOR
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL
DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

MARIA ISABEL FUENTES PARRA

Efeito da irradiância e disponibilidade de nitrogênio no crescimento, teor de clorofila, perfil de glicerídeos totais e potencial antioxidante de *Desmodesmus* sp.

SALVADOR- BA, BRASIL
2016

MARIA ISABEL FUENTES PARRA

Efeito da irradiância e disponibilidade de nitrogênio no crescimento, teor de clorofila, perfil de glicerídeos totais e potencial antioxidante de *Desmodesmus* sp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andrade Sales

Co-Orientador: Prof. Dra. Fungyi Chow

Co-Orientador: Prof. Dra. Louisa Wessels Perelo

SALVADOR-BA, BRASIL.

2016

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

FUENTES PARRA, MARIA ISABEL
Efeito da irradiância e disponibilidade de nitrogênio no crescimento, teor de clorofila, perfil de glicerídeos totais e potencial antioxidante de Desmodesmus sp. / MARIA ISABEL FUENTES PARRA. -- Salvrdoi, 2016.
89 f. : il

Orientador: Emerson Andrade Sales.
Coorientadora: Fanly Fungyi Chow Ho.
Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação em Engenharia Industrial) -- Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, 2016.

1. microalga. 2. crescimento. 3. clorofila. 4. potencial antioxidante. 5. glicerídeos. I. Andrade Sales, Emerson. II. Chow Ho, Fanly Fungyi. III. Título.

EFEITO DA IRRADIÂNCIA E DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO, TEOR DE CLOROFILA, PERFIL DE GLICERÍDEOS TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *DESMODESMUS* sp.

María Isabel Fuentes Parra

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Engenharia Industrial da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia – UFBA, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Profa. Dra. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque _____
Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal da Bahia – Brasil
Universidade Federal da Bahia – UFBA– Escola Politécnica

Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes _____
Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas - Brasil
Universidade Federal da Bahia – UFBA -Escola de Nutrição.

Profa. Dra. Carla Fernandes Macedo _____
Doutorado em Aquicultura. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

Salvador
2016

À:

Minha querida família: Alberto, Moni, Jesús, Juanis e Rosario, que sempre tiveram tempo para me escutar e brindar o apoio moral em todo momento.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer infinitamente ao meu Pai Alberto, pessoa que me deu todo o apoio que precisei: econômico, amoroso e, sobretudo, moral. À você posso dizer que concluí esta etapa. Obrigada por nunca me deixar desistir, nem mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Lupita, que não está fisicamente comigo, mas foi quem me impulsionou a lutar por esta oportunidade, embora doente, sempre quis que eu vivesse esta experiência. Sinto muito tua falta, mas tenho a certeza de que sempre, espiritualmente, você estará comigo, cuidando de mim.

Aos meus irmãos Juan Carlos e Alberto por me encherem de alegria e amor, porque eles sempre apartavam a tristeza e os maus momentos. Adoro vocês com toda minha alma.

À minha irmã favorita Monica, por ser esse pilar em casa e por ter suportado os conflitos sozinha quando deveriam ser divididos. Desculpa minha ausência, mas prometi que voltaria para você começar a viver como eu fiz.

À minha avó Rosario, por ser nossa mãe, por cuidar dos meus irmãos e do meu pai, por sempre se preocupar comigo e por me presentear com teu sorriso cada vez que nos falamos. Por todas as “enchildas” preparadas. Eu te amo abue.

Aos meus tios e tias, por me apoiarem em todos os sorteios e sempre organizar as boas-vindas, etc., mas especialmente à Angélica por sempre estar ao meu lado, cuidando e dando-me ânimo, para continuar em busca de meus projetos.

Ao Dr. Emerson, meu orientador. Por ter me facilitado as ferramentas para concluir este projeto no Labec. À Dra. Louisa por ser objetiva com meu trabalho e por todo o apoio.

À Dra. Fungyi, minha co-orientadora. Não tenho como agradecer por todo o suporte, tanto moral como profissional. Por todo o tempo dedicado neste trabalho, pela orientação que recebi, por me apresentar às diferentes turmas da Botânica. Por ser uma pessoa realmente dedicada ao ensino e acréscimo do intelecto e a ciência, além de ser uma pessoa aberta para os seus alunos e com a disposição de ajudar e sempre apreciar o lado positivo das coisas. Por abrir os meus horizontes e me dar

motivos para continuar estudando. Pela oportunidade de trabalhar no LAM, agradeço à equipe (Luzka, Talissa, Vanessa e Alex) pelo acolhimento e abertura. Especialmente à Ana pelo tempo e pela paciência dedicados em me ensinar diversas técnicas aplicadas neste trabalho.

À galera do Labec (Gea, Vivi, Nick, Victor e Marianita), por ter boa atitude para trabalhar em equipe, com o melhor dos sorrisos e com a coragem como melhor ferramenta. Ao Leo por ser meu guia pessoal do PEI. Mas, especialmente, às amigas que ali construí, à Sonia, à Marianete e à Luiza, por iluminar as minhas ideias e por me corrigir nos erros, pela inteligência e os incríveis momentos compartilhados. Pelo apoioumasnas outras, porque as verdadeiras amizades se criam nos momentos mais difíceis. Saibam que nosso caminho ainda é longo como amigas e como colegas. Vocês têm sido um pilar, cada uma tão diferente, mas indispensável. À miss congresso (dona Kamayura) por cada sorriso e gargalhada contagiosa, lembrareivocê a vida toda.

Às minhas amigas Ana, Gaby e Lupita, por terem me apoiado na decisão de vir morar no Brasil e por me manter informada dos acontecimentos cotidianos. Embora nossas vidas tenham mudado de um momento para outro, nossa amizade continua além do espaço, tempo e fronteiras. Por me darem maravilhosos motivos para voltar ao México.

Ao Combo Latino por ter feito minha estadia em Salvador tão maravilhosa, divertida e cheia de amizade, porque os considero meus irmãos de terras diferentes, mas unidos na mesma atitude.

À galera Sim/Si (Aline, Rafa, Lola, Leo, Gus e Ro) por mudar minha ideia do mundo e me mostrar a verdadeira vida paulista. Pela amizade brindada desde o primeiro dia que cheguei até hoje. Tenho aprendido mais vocabulário com vocês que no dicionário, sem falar das boas músicas, piadas, filmes e paradas legais.

Este agradecimento é especial à minha melhor amiga Gabriela. Ninguém acreditaria que você e eu falamos tanto, por todos os planos em comum, pelas nossas conversas diárias, por me escutar nos momentos difíceis e por me alentar nos bons. Pelos segredos compartilhados, por nosso passado, presente e futuro como amigas. Porque a coisa mais triste do dia se apaga quando a gente se fala.

Amo-te muito, minha querida. Por tudo, lembra que é bom nos expressar corretamente e por favor, -“nunca te quedes com las ganas de nada”. Beijos.

A todos meus amigos nos diferentes cantos do mundo, por ter conhecido vocês, por me ensinar da sua cultura, seu país, sua religião, suas comidas, etc., por todos aqueles momentos e as alegrias compartilhadas. Vocês sabem que os levo no coração e lembro-me de vocês.

À Organização dos Estados Americanos, à CAPES e ao Governo Brasileiro pelo suporte financeiro e a bolsa de estudo.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintetizantes com a capacidade de gerar uma variedade de produtos naturais com grande valor comercial. Alguns gêneros podem ser utilizados para consumo humano, já que apresentam alto conteúdo de lipídios, proteínas, pigmentos, vitaminas e minerais, além de outras biomoléculas de proteção como, por exemplo, substâncias antioxidantes e aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). Pesquisas têm demonstrado que mudanças na intensidade de luz e disponibilidade de nitrogênio influenciam diretamente no crescimento das microalgas, conteúdo pigmentar, ácidos graxos e potencial antioxidante,dentre outros. Para *Desmodesmus* sp., proveniente do Dique de Tororó em Salvador-BA, foi avaliada a taxa de crescimento, teor de clorofila, glicerídeos totais, potencial antioxidante e MAAs sob duas condições de intensidade de PAR, 80 e 200 µmol de fotons.m^{-2}.s^{-1}, e meio Bold's Basal Medium (BBM) com 250 e 500 mg.L^{-1} de $NaNO_3$. Foram realizadas duas bateladas de experimentos, a primeira foi mantida durante 29 dias e as culturas que apresentaram maior taxa de crescimento foram L-80.500 e L-200.500 com 2,3 $X10^6$ cel.mL^{-1}. A segunda batelada foi mantida durante 14 dias, apresentando maior taxa de crescimento na culturaV-200.500, com 1,36 $X10^6$ cel.mL^{-1}. A partir dos resultados é possível afirmar que o aumento na quantidade de nitrogênio estimulou a produção de biomassa, no entanto, sob intensidade de luz maior há redução do período da fase estacionária, fase que está relacionada à produção de vários metabólitos de interesse. Para a segunda batelada, além de realizar as contagens celulares, foi realizada a técnica de densidade ótica, assim como a quantificação de clorofila. Houve uma relação diretamente proporcional no teor de clorofila com aquantidade de biomassa produzida para todos os tratamentos, donde a cultura V-200.500 teve 65% mais clorofila que os outros tratamentos. O tratamento que apresentou uma quantidade maior de ácidos graxos foi L-200.250 com 20,19 mg.g^{-1}BL. As análises do potencial antioxidante mostraram resultados para ABTS entre 76,8 - 100% de atividade nos tratamentos L-200.250 e V-80.500, respectivamente; para o método de Folin-Ciocalteu o menor valor foi apresentado pelo tratamento L-200.250 com 86,9% de atividade e o maior valor (174,2%) para o tratamento V-80.500. No entanto, para o ensaio de FRAP, os tratamentos L apresentaram maiores valores de atividade, o valor máximo foi 179,9% no tratamento L-80.500, enquanto o menor valor foi 47,2% para o tratamento V-

200.500.Os resultados obtidos neste trabalho mostram importantes informações para subsidiar a produção de biomassa de *Desmodesmus* sp. e obtenção de metabólitos com interesse de aplicação biotecnológicaa fim de contribuir para uma melhor interpretação do papel desses fatores na geração de biomassa e de bioprodutos de interesse comercial.

Palavras chaves: microalga, crescimento, clorofila, potencial antioxidante, glicerídeos.

Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms with the ability to generate a different kind of natural products with potential commercial value. Some genus are used for human uses, because have high content of lipids, proteins, chlorophyll, carotenoids, vitamins and minerals, in addition, protect biomolecules like mycosporines (MAAs). The variations of light intensity and the quantity of nitrogen influence the growth of the inoculum, pigment contents such as chlorophylls and carotenoids, as well as profile total glycerides and antioxidant potential. *Desmodesmus* sp., sampled from the Tororo's Dike in Salvador Bahia, was cultivated with two types of irradiance (80 and 200 µmol.photons.m^2.s^{-1}) PAR light, grown in Bold's Basal Medium and means adding 250 mg.L^{-1} $NaNO_3$. Two batches of experiments were carried out, the first was held for 29 days and higher growth rate was showed by the L-80.500 and L-200.500 cultures, with 2.3 $X10^6$ cel.mL^{-1}. The second batch was held for 14 days, culture V-200,500 showed higher growth rate with 1.36 $X10^6$ cel.mL^{-1}. From the results, was clear that the increase in the amount of nitrogen stimulated the production of biomass, however, at a higher light intensity reduce the stationary phase period, which phase is related to the production of interested metabolites. For the second batch, also cell counts, the optical density technique was performed, as well as the quantification of chlorophyll. Chlorophyll content was directly proportional relationship with biomass produced for all treatments, where the V-200.500 culture had 65% more chlorophyll than the other treatments. The treatment showed an increased amount of fatty acids were L-200.250 with 20.19 mg.g^{-1}BL. The antioxidant potential analysis showed between 76.8 to 100% of activity for ABTS in the L-200,250 and V-80,500 treatments, respectively; for Folin-Ciocalteu method the lowest value was presented by L-200,250 treatment with 86.9% uptime and the highest value (174.2%) for the V-80,500 treatment. However, for the FRAP assay, L treatments showed higher activity values, the maximum value was 179.9% in L-80.500, while the lowest was 47.2% for V-treatment results 200.500. these results show important information to support the production of biomass *Desmodesmus* sp. and obtaining metabolites with biotechnological application and contribute to a better interpretation of the role of these factors in the biomass and bioproducts production.

Key words: microalgae, growth, chlorophyll, antioxidant potential, glycerides.

SUMARIO

LISTAS DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 18
1. INTRODUÇÃO 19
Hipóteses 21
2. OBJETIVOS 22
2.1. GERAL 22
2.2. ESPECÍFICOS 22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23
3.1. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUTIVIDADE DAS MICROALGAS 24
3.2. ETAPAS DO CULTIVO DE MICROALGAS 25
3.3. BIOMOLÉCULAS PRODUZIDAS PELAS MICROALGAS 26
3.3.1. Clorofila 27
3.3.2. Lipídios 27
3.3.3. Aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) 31
3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MICROALGAS 31
3.5. *Desmodesmus* sp. 33
4. MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1. RE-ISOLAMENTO CLONAL E CULTIVO AXÊNICO DE *Desmodesmus* sp. 36
4.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA 37
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 38
4.4. TAXA DE CRESCIMENTO 40
4.5. QUANTIDADE DE CLOROFILAS *a* E *b* 41
4.6. GLICERÍDEOS TOTAIS 42
4.6.1 Determinação da quantidade de glicerídeos totais 42
4.7. POTENCIAL ANTIOXIDANTE 42
4.7.1. Procedimento de extração das amostras 42
4.7.2. Captura do radical livre ABTS 43
4.7.3. Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu 43
4.7.4. Ensaio da redução do ferro - FRAP 44
4.8. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs) 44
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 45
5. RESULTADOS 46

5.1. RE-ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DA CULTURA *Desmodesmus* sp. 46
5.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA 46
5.3. TAXA DE CRESCIMENTO 47
5.4. QUANTIDADE DE CLOROFILAS *a* E *b* 54
5.5. ANALISE QUANTITATIVA DE GLICERÍDEOS EM *Desmodesmus* sp. 55
5.6. POTENCIAL ANTIOXIDANTE 57
5.6.1. Captura do radical livre ABTS 57
5.6.2. Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu 58
4.6.3. Ensaio da redução do ferro - FRAP 60
5.7. ANÁLISE DO PERFIL AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs) 62
6. DISCUSSÃO 63
6.1. RE-ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DA CULTURA *Desmodesmus* sp. 63
6.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA **Erro! Indicador não definido.**
6.3. TAXA DE CRESCIMENTO 64
6.4. QUANTIDADE DE CLOROFILAS *a* E *b* 66
6.5. PERFIL GLICERÍDEOS TOTAIS 66
6.6. POTENCIAL ANTIOXIDANTE 67
6.7. AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs) 69
7. CONCLUSÕES 71
ANEXO I. Metodologia de isolamento de cepas modificada de SUREK & MELKONIAN (2004). 72
ANEXO II. Esquema de uma câmera de Neubauer. 83
ANEXO III. Metodologias para a determinação de glicerídeos totais. 84
ANEXO IV. Cromatograma do Mix: monoglicerídeos (MAGs), diglicerídeos (DAGs) e triglicerídeos (TAGs) na concentração de 40 $mg.mL^{-1}$, usando como padrão interno Metil-Heptadecanoato (MHD). 85
ANEXO V. Curvas de calibração [5-40 $mg.mL^{-1}$] para monoglicerídeos (MAGs) R^2= 0,99, diglicerídeos (DAGs) R^2= 0,95 e triglicerídeos (TAGs) R^2=0,96. 85
ANEXO VI. Curvas padrões de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA para o ensaio de potencial antioxidante segundo o método de ABTS. Valores de média ± desvio padrão (n = 3). 86
ANEXO VII. Curvas padrões de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA para o ensaio de potencial antioxidante segundo o método de Folin-Ciocalteu. Valores de média ± desvio padrão (n = 3). 87
ANEXO VIII. Curvas padres de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA para o ensaio de potencial antioxidante segundo o método de FRAP. Valores de média ± desvio padrão (n = 3). 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AG	Ácido gálico
AOX	Antioxidante
B	Boro
BBM	Bold's Basal Medium
BHA	2-tert-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol
BL	Biomassa liofilizada
Ca	Cálcio
Chl *a*	Clorofila *a*
Chl *b*	Clorofila *b*
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO_2	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
D.O.	Densidade óptica
DAGs	Diglicerídeos
DGDG	Digalactosil-diacilglicerol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC_{50}	Concentração efetiva para induzir 50% do efeito máximo
EAA	Equivalente de ácido ascórbico
EP	Equivalente padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
FRAP	Potencial de redução dos íons de ferro
K	Potássio
Ln	Logaritmo natural
MAGs	Monoglicerídeos
MGDG	Monogalactosil-diacilglicerol
MeOH	Metanol
Mg	Magnésio
MHD	Metil-heptadecanoato
Mn	Manganêso
Mo	Molibdênio

n.i.	Não identificados
Na	Sódio
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
$NaNO_3$	Nitrato de sódio
NOx	Óxidos de nitrogênio
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm)
ppmv	Partes por milhão por volume
pH	Potencial de hidrogênio
S	Enxofre
Sc	Sem cálculo
Se	Selênio
Ta	Temperatura ambiente
TAGs	Triglicerídeos
TC	Taxa de crescimento
v/v	Volume/volume
V	Vanádio
Zn	Zinco
μ	Velocidade de crescimento

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Esquema gráfico da curva de crescimento de microrganismos em sistemas fechados segundo o descrito por Lourenço (2006). 26
Figura 2 – Esquema do comportamento celular devido ao estresse de queda de nitrogênio que induz mudanças em Scenedesmus sp. (PANCHA et al., 2014). 28
Figura 3 -*Desmodesmus* opoliensis (P. Richer) E. Hegewald. Fonte: The Japanese Fresh-water Algae (1977).....33
Figura 4 - Localização do Dique de Tororó, Salvador-BA, Brasil, local de procedência do material. 35
Figura 5 - Metodologia para o re-isolamento da microalga *Desmodesmus* sp. 37
Figura 6 - Representação da metodologia para a produção de biomassa de Desmodesmus sp.....38
Figura 7 - Culturas assépticas de *Desmodesmus* sp. (07/agosto/2014 BBM) cultivadas em meio sólido BBM. A) Semeadura em placa de Petri e B) Semeadura em tubos de vidro.....46
Figura 8 - *Desmodesmus* sp. em meio líquido BBM.a) 6 e b) 15 dias após o inóculo, c) Segunda etapa da produção de biomassa em volumem de 100 mL, **d**) Última etapa da produção de biomassa em volume de 1000 mL (cultura mãe).....47
Figura 9. Curvas de crescimento de *Desmodesmus* sp. L baseado no Número de células durante 29 dias em diferentes condições: A) L.80-250; B) L-80.500; C) L-200.250; D) L-200.500. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5).....48
Figura 10 - Culturas de *Desmodesmus* sp. mostrando mudança na coloração após 29 dias de inoculação nos diferentes tratamentos. 49
Figura 11 - Curvas de crescimento de *Desmodesmus* sp. baseado no Número de células durante 14 dias em diferentes condições: A) V-80.250; B) V-80.500; C) V-200.250; D) V-200.500. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5).....50
Figura 12 - Curvas de crescimento de *Desmodesmus* sp. V baseado na técnica de turbidez (densidade óptica) durante 14 dias em diferentes condições:A) V-80.250; B) V-80.500; C) V-200.250; D) V-200.500. 52

Figura 13 - Correlação entre a contagem e a medida da turbidez nas culturas de *Desmodesmus* sp. durante 14 dias nos tratamentos a) V-80.250, b) V-80.500; c) V-200.250; d) V-200.500.....53
Figura 14 - Aspecto geral da mudança na coloração das culturas V ao longo dos 14 dias de crescimento para todos os tratamentos. 53
Figura 15 - Concentração de clorofilas a e b (mg.L^{-1}), correspondentes aos diversos tratamentos das culturas V. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05). 54
Figura 16 - Cromatograma para o perfil de glicerídeos da amostra **L-80.500,** apresentando monoglicerídeos (MAGs), diglicerídeos (DAGs), triglicerídeos (TAGs) e ácidos Não Identificados (n.i.). 56
Figura 17- Porcentagem das frações glicéricas (mono-, di- e triglicerídeos) nos diferentes tratamentos de Desmodesmus sp. 56
Figura 18- Porcentagem do potencial antioxidante pelo ensaio de ABTS de extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V e L nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05).....57
Figura 19 - Ação antioxidante em equivalentes padrão de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA pelo método de ABTS para extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos **V** e **L** nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05). 58
Figura 20- Porcentagem do potencial antioxidante pelo ensaio de Folin-Ciocalteu de extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05). 59
Figura 21- Ação antioxidante em equivalente padrão de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA pelo método de Folin-Ciocalteu para extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de

média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05).....60
Figura 22 - Porcentagem do potencial antioxidante pelo ensaio de Frap de extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05). 61
Figura 23- Ação antioxidante em equivalente padrão de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA pelo método de FRAP para extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas (p < 0,05). 62
Figura 24- Cromatograma de análise de MAAs em fase reversa e espectro de absorção na faixa de 200-550 nm para a amostra V-80.250de *Desmodesmus* sp. TIRAR? .....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produtos de valor comercial gerados a partir de cianobactérias e microalgas, produção anual. Adaptada de BRENNAN& OWEDE (2009) e ALGAEMAGAZINE (2014). 24
Tabela 2. Espécies de microalgas que mostram mudanças no conteúdo lipídico submetidas a stress nutricional. 29
Tabela 3. Mudanças no conteúdo lipídico em microalgas submetidas a diferentes condições luminosas. 30
Tabela 4. Espécies de microalgas que mostraram atividade antioxidante mediante diversos ensaios.....32
Tabela 5. Principais componentes que constituem o meio BBM, com modificações. 36
Tabela 6. Composição da solução de metais traço do meio BBM. 36
Tabela 7. Composição de F/2 solução de vitaminas.....36
Tabela 8. Combinação dos fatores e níveis dos fatores que representam os quatro tratamentos deste estudo.....39
Tabela 9. Velocidades de crescimento (No. células.dia^{-1}) nas diferentes fases da cultura de Desmodesmus sp. submetida aos diferentes tratamentos. 49
Tabela 10. Velocidades de replicação celular (k).dia^{-1} nas diferentes fases da cultura de Desmodesmus sp. submetida aos diferentes tratamentos. 49
Tabela 11. Velocidades de crescimento (No. Células.dia^{-1}) das amostras do segundo experimento com Desmodesmus sp. (V).....51
Tabela 12. Velocidades de replicação celular (k).dia-1 das amostras do segundo experimento com Desmodesmus sp. (V). 51

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia de microalgas tem ganhado interesse nas últimas duas décadas devido à ampla variabilidade de aplicações que estes microrganismos possuem, desde a produção de biomassa para alimentação, aquacultura, biofertilizantes e biocombustíveis, além de serem usados em tratamentos terapêuticos (DERNER et al., 2006; GOUVEIA & OLIVEIRA, 2009). Sua eficácia é considerada superior à verificada pelas tradicionais culturas vegetais terrestres, devido a sua velocidade de replicação (DUARTE, 2010).

Segundo o relatório anual da AlgaeIndustry Magazine (2015), o mercado de produção de biomassa de microalgas para consumo gera ao redor de 200 milhões de euros por ano. No entanto, produtos como carotenoides e ômega-3 são avaliados dependendo do seu grau de pureza de cada composto. Em 2014, a Secretaria do Meio Ambiente dos Estados Unidos reportou um grande investimento no desenvolvimento de tecnologias para produção de bioenergia proveniente de microalgas (ABO, 2015).

As microalgas podem ser cultivadas em condições naturais de exposição aos raios solares, temperatura e umidade do ar. Por este motivo, possuem a capacidade de acumular biomoléculas, ou apresentar atividade antioxidante como mecanismos de defesa aos fatores ambientais.

O ² -caroteno (caroteno), a astaxantina (xantofila), a zeaxantina (xantofila) e a vitamina E podem ser destacados como os antioxidantes de maior importância no mercado global (DERNER et al., 2006). Outras moléculas que têm gerado atenção especial de pesquisadores são os aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs), pois além de seu poder antioxidante possuem a capacidade de absorver raios UV (SONNTAG et al., 2007).

De uma forma geral, a produção de biomoléculas de interesse a partir das microalgas requer conhecimentos sobre o metabolismo da célula, e como as condições de crescimento (modificações no cultivo) podem alterar a rota metabólica e a atividade catalítica de enzimas, assim como modificações nos produtos intermediários e finais (GRIMA, 2003).

Existe uma série de trabalhos que avaliam o efeito das condições de estresse nutricional e ambiental no acúmulo de ² -caroteno em *Dunaliella salina*, uma

Chlorophyta de água salina; de astaxantina, luteína e fitoeno em *Haematococcus pluvialis* e *Chlamydomonas*, microalgas de água doce, entre outras (SILVA et al., 2003; BECKER, 2004; MULLER-FEUGA, 2004; DENNER, 2006). Alguns gêneros da família Chlorophyceae, como *Chlorella* e *Scenedesmus*, têm ganhado interesse devido ao seu conteúdo nutricional semelhante à cianobactéria *Spirulina* (KENT et al., 2015). Portanto, os estudos das propriedades que as diferentes microalgas podem apresentar sob as diversas condições de cultivo apresentam suma importância na produção de bioprodutos e aditivos nutricionais.

Hipóteses

As hipóteses que norteiam este estudo são:

H1. Quando exposta a condições de aumento da intensidade de PAR (do inglês *Photosynthetically Active Radiation*) e menor disponibilidade de nitrato, *Desmodesmus* sp. apresentará diminuição na sua taxa de crescimento e produção de clorofila, em razão de condição de estresse celular.

H2. Em decorrência de uma menor disponibilidade de nitrato, a quantidade de ácidos graxos de *Desmodesmus* sp. irá aumentar, apresentando variações sob as diferentes intensidades de PAR.

H3. *Desmodesmus* sp. cultivada em condições de estresse de PAR e nitrato irá exibir aumento do potencial antioxidante e variação no perfil de MAAs como resposta de defesa contra estresse

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Estudar em laboratório o efeito da intensidade de luz e quantidade de nitrato na produção de biomassa, a composição química e potencial antioxidante de *Desmodesmus* sp.

2.2. ESPECÍFICOS

a. Avaliar a produção de biomassa de *Desmodesmus* sp. cultivada sob dois diferentes regimes de luz e disponibilidade de nitrato, por meio da análise da taxa de crescimento celular e conteúdo de clorofilas *a* e *b*.

b. Analisar a variação de glicerídeos de *Desmodesmus* sp. submetida a diferentes regimes de luz e disponibilidade de nitrato, mediante cromatografia gasosa.

c. Avaliar o efeito da intensidade de luz e disponibilidade de nitrato em culturas de *Desmodesmus* sp. sobre o potencial antioxidante, através dos ensaios de sequestro do radical ABTS, potencial redutor pelo Folin-Ciocalteu e redução do ferro (FRAP).

d. Analisar a variação da síntese de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) em culturas de *Desmodesmus* sp. sob dois diferentes regimes de luz e disponibilidade de nitrato mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existem inúmeros produtoselaborados a partir de microalgas, aqueles com menor valor agregado como fertilizantes e alimentos para aquicultura, e aqueles com alto potencial de exploração comercial, como ácidos graxos poli-insaturados (EPA e DHA), carotenoides (astaxantina, ² -caroteno, luteína e zeastaxantina), ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes redutores do colesterol, pigmentos, ficocoloides, lecitinas e MAAs) (DERNER *et al.,* 2006; CARRETO, 2011). Atualmente, as microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar, e podem ser encontradas em formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos (BECKER, 2004; COLLA *et al.,* 2004; PULZ & GROSS, 2004; DERNER *et al.,* 2006; GREBOW, 2016).

Algumas espécies de microalgas e cianobactérias têm sido identificadas e reconhecidas pela presença de substâncias de interesse comercial na sua composição celular. Devido à facilidade de produção desses metabólitos ou ao acúmulo deles, estes organismos têm resultado interessantes para a sua produção em escala industrial(MALGAS, 2013). A Tabela 1 mostra a produção anual de biomassa e o valor comercial dos produtos que se obtêm a partir dessas espécies.

A Organização Biomassa Algae tem reportado 600 empresas nos Estados Unidos focadas no desenvolvimento de produtos de microalgas. Simultaneamente, o governo investe a cada ano no desenvolvimento de novas energias a partir destes organismos (ABO, 2015). A produção mundial anual da cianobactéria *Spirulina* é de 3.000 toneladas de biomassa em massa seca, a partir desta biomassa são gerados cosméticos e produtos de consumo humano e animal; outro produto que gera grande porcentagem de lucro é o ômega-3, vendido a valores acima de 160 dólares por quilograma (OILGAE, 2015).

Tabela 1. Produtos de valor comercial gerados a partir de cianobactérias e microalgas, produção anual. Adaptada de BRENNAN& OWEDE (2009) e ALGAEMAGAZINE (2014).

Espécie	Produção anual (T)	País produtor	Aplicação e produto	Preço (€)
Spirulina	3.000 de peso seco	China, Índia, USA, Japão, Myanmar	Nutrição humana e animal Cosméticos Ficobiliproteínas	36.kg^{-1} 11.mg^{-1}
Chlorella	2.000 de peso seco	Taiwan, Alemanha, Japão	Nutrição humana Cosméticos Aquicultura	36.kg^{-1} 50.L^{-1}
Dunaliella salina	1.200 de peso seco	Austrália, Israel, USA, Japão	Nutrição humana Cosmético ^{2} caroteno	215-250.kg^{-1}
Hematococcus pluvialis	300 de peso seco	USA, Índia Israel	Biomassa Astaxantina	50.L^{-1} 7150.kg^{-1}
Crypthecodinium cohnii	4,6	USA	DHA	160.kg^{-1}

DHA: ácido docosaexaenoico. T: tonelada.

3.1. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUTIVIDADE DAS MICROALGAS

Os fatores determinantes na produtividade das microalgas são pH do meio, salinidade, disponibilidade e concentração de nutrientes, intensidade luminosa, período e tipo de luz, temperatura, densidade celular da cultura e facilidade de contaminação por outros organismos (RADMANN & COSTA, 2008; WANG *et al.,* 2010; YEH & CHENG, 2012).

Tratando-se de um sistema de cultura autótrofo, a luz é um dos fatores principais no processo de fotossíntese. As microalgas podem crescer em diferentes intensidades de luz, fato que provoca mudanças na composição química, teor de pigmentos e atividade antioxidante (RICHARDSON, 1983). No entanto, a energia não é acumulável, porém deve ser administrada continuamente (GRIMA *et al.,* 2003).

O fornecimento de luz não pode ser definido como um parâmetro só, pois entra em jogo a intensidade, a frequência dos ciclos e os tempos de claro-escuro. O crescimento destes organismos fotoautótrofos é proporcional à luz recebida, enquanto não ultrapasse o nível máximo de fototolerância, já que as culturas podem apresentar danos ou ser fotoinibidas (CHISTI, 2007). As microalgas têm

demonstrado eficiência na conversão de luz-biomassa entre 1 e 4% em sistemas abertos, e ainda maiores porcentagens em fotobiorreatores (STEPHENS, 2010).

Entender o mecanismo das microalgas sobre a produção de metabólitos de interesse determina as condições às quais elas devem ser submetidas. No entanto, uma maior produção de biomassa possibilitaria uma maior quantidade de metabólitos secundários (KALPESH *et al.,* 2012).

De forma geral, pode se resumir duas etapas para o cultivo de microalgas. A primeira foca na geração de biomassa suficiente, onde a célula precisa de nutrientes e condições de crescimento favoráveis. E uma segunda etapa para a produção de metabólitos secundários, na maioria resultante de mecanismos de defensa a estresse abiótico ou falta de nutrientes (TAKAGI *et al.,* 2006; CHU *et al.,* 2011; CHU, 2012).

3.2. ETAPAS DO CULTIVO DE MICROALGAS

Segundo Lourenço (2006), durante um cultivo, geralmente ocorrem cinco fases de crescimento: lag, log, redução do crescimento, estacionária e de declínio (Figura 1). A fase lag é marcada pela aclimatação das células de um cultivo preexistente ao ambiente novo, sendo crítica a intensidade luminosa, assim como os períodos de claro-escuro e a disponibilidade de nutrientes no meio.

Uma vez que a cultura consegue se habituar ao novo ambiente, entra em fase log (fase logarítmica ou exponencial), onde a taxa de crescimento torna-se maior e constante por curto período. Nesta fase, a energia luminosa que a célula recebe é transformada pelos cloroplastos, motivo pelo qual, a quantidade de clorofila está diretamente vinculada à produção de biomassa (ALBERTS *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2008; SOLOVCHENKO, 2013).

Na fase de redução do crescimento ocorre o aumento na concentração celular no cultivo, momento em que ocorre falta de nutrientes para todas elas. Na fase estacionária se o crescimento diminui, e a cultura atinge o seu rendimento final máximo, a célula muda o metabolismo de síntese e acúmulo de biomassa e começa a ativar mecanismos de proteção por estresse nutricional e oxidativo (RODOLFI *et al.*, 2009).

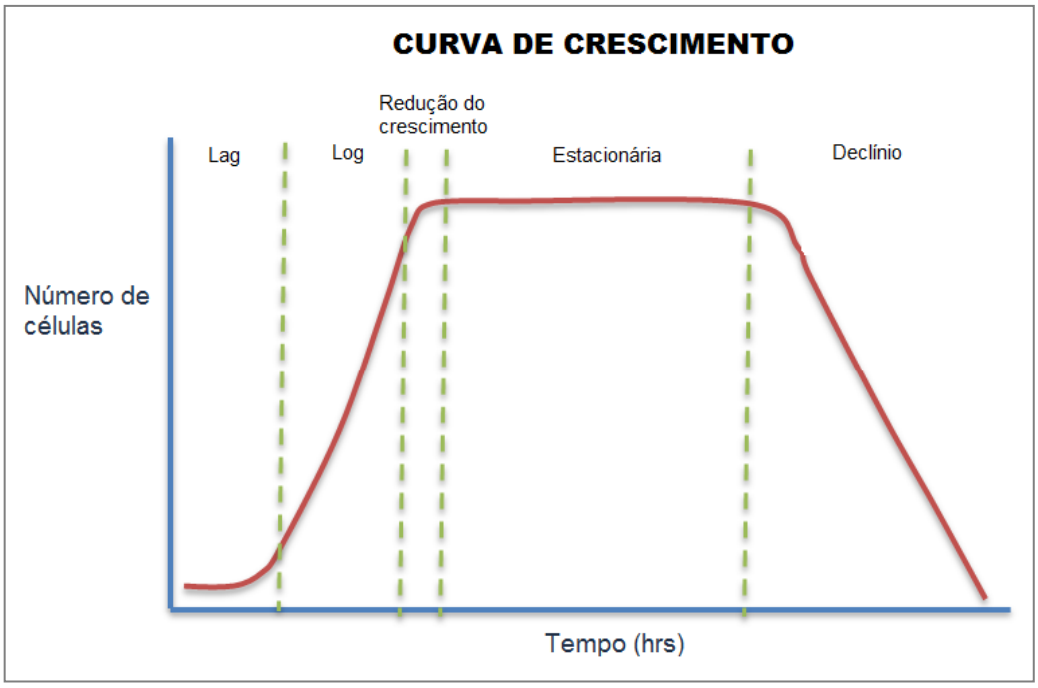


Figura 1. Esquema gráfico da curva de crescimento de microrganismos em sistemas fechados segundo o descrito por Lourenço (2006).

A fase de declínio é marcada pela lise de muitas células e uma taxa de crescimento negativa, uma vez que pouquíssimas células ainda podem crescer e um número muito maior de indivíduos morre.

Atualmente, o nutriente mais utilizado para a realização de estudos fisiológicos de microalgas é o nitrogênio. Usualmente é utilizado o nitrato, mas também poderiam ser usadas fontes de ureia, nitratos, amônios, dentre outras (HU *et al.,* 2006; HSIEH & WU, 2009; LI *et al.*, 2011; YEH & CHANG, 2011; PRAVEENKUMAR *et al.,* 2012). Existe uma tendência geral para o acúmulo de lipídios, particularmente de triglicerídeos,observado em numerosas espécies de microalgas como resposta à deficiência de este nutriente.

3.3. BIOMOLÉCULAS PRODUZIDAS PELAS MICROALGAS

Existem inúmeras biomoléculas sintetizadas pelas microalgas, algumas presentes durante a fase de crescimento como os pigmentos fotossintéticos característicos das mesmas, e outras biomoléculas geradas a partir de estresse, tanto oxidativo e nutricional, como são os lipídios, ácidos graxos, pigmentos

secundários, etc.(BECKER, 2004; DERNER *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 2013; GREBOW, 2016).

3.3.1. Clorofila

Dentre as biomoléculas produzidas pelas microalgas, a clorofilaé um composto rico em nitrogênio, forma parte do grupo de compostos bioativos de valor comercial, além de conferir a facilidade de troca de CO_2 por O_2 na célula e é responsável pela fotossíntese (ARIS *et al.,* 2010).

As microalgas verdes apresentam uma alta quantidade de clorofila (aproximadamente0,1–1%biomassa/volume), além de produzir a clorofila *a* produzem clorofila *b*, considerado um pigmento acessório que ajuda para que o processo de fotossíntese seja mais eficiente (WETZEL, 2001; CALLAWAY, 2010; FITCH & KEMKER, 2014).

A limitação por nitrogênio afeta a fotossíntese, pois reduz a eficiência de captação de energia devido à perda de clorofila e, por conseguinte, pode conduzir ao aumento de pigmentos auxiliares como os carotenoides (BERGES *et al.,* 1996; BERTOLDI *et al.*, 2008; MALGAS, 2013; SOLOVCHENKO, 2013; GRABSKI, 2015).

3.3.2. Lipídios

As microalgas em condições normais de cultura apresentam um conteúdo de lipídios que varia entre 20 e 50% do seu peso seco, no entanto, quandosubmetidas a situações de estresse pode aumentar sua fração lipídica, fato que conduz ao aumento da fração glicérica e de ácidos graxos (SOCCOL *et al.,* 2013; GONÇALVES, 2014; KRZEMICSKA *et al.,* 2015).

Os ácidos graxos das microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (RICHMOND, 2004). NaFigura 2, se mostra o comportamento da Chlorophyta *Scenedesmus* quando a cultura foi submetida a condições de ausência e declínio da fonte de nitrogênio. Consequentemente, a cultura mostrou perda de clorofila, por outro lado, a produção de lipídios totais representaram 27,93% da biomassa seca (PANCHA *et al.,* 2014).

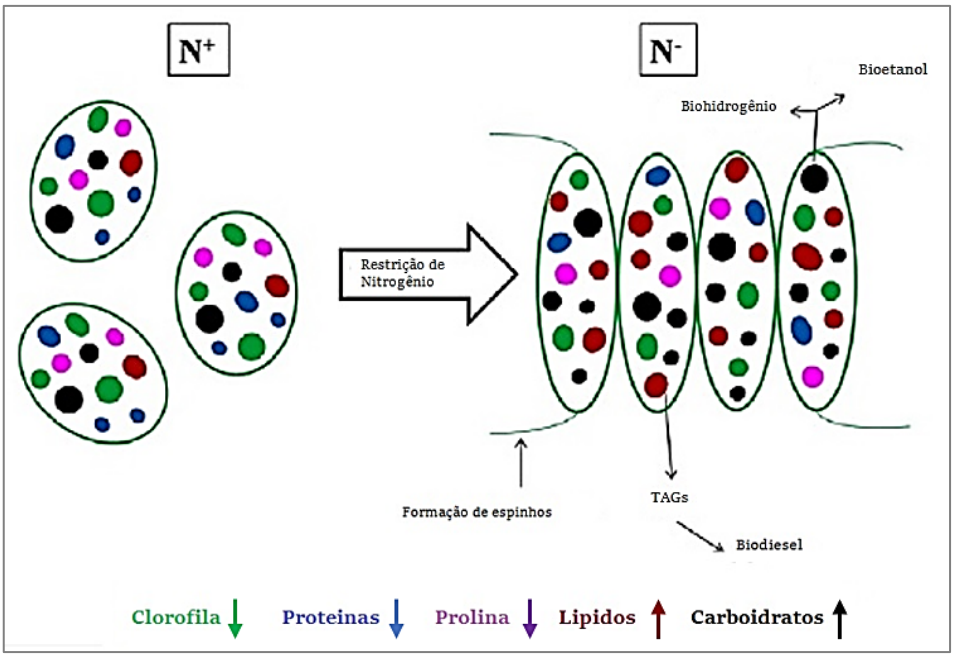


Figura 2–Esquema do comportamento celular devido ao estresse de queda de nitrogênio que induz mudanças em *Scenedesmus* sp. (PANCHA*et al.*,2014).

Os lipídios encontrados em microalgas são constituídos principalmente de duas frações: lipídios neutros e lipídios polares. Os lipídios polares são compostos de monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAGS), sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) e fosfatidilglicerol. A fração neutra consiste, principalmente, de pigmentos (PIRES *et al.,* 2013).

Uma das técnicas mais utilizadas para promover a síntese de lipídios em microalgas é o estresse por falta de nutrientes, em especial o nitrogênio. CHU*et al.* (2014) mostraram que privação de nitrogênio mas com fornecimento de suficiente fósforo conduzia a uma maior quantidade de lipídios em *Scenedesmus obliquus.* A Tabela 2 resume algumas espécies de microalgas que mostraram mudanças no conteúdo de lipídios devido ao estresse por nutrientes. A maioria dos autores reporta uma produtividade inversamente proporcional ao conteúdo de nitrogênio.

Tabela 2. Espécies de microalgas que mostram mudanças no conteúdo lipídico submetidas a stress nutricional.

Microalga	Estresse nutricional	Luminosidade (µmol fótons.m^{-2}.s^{-1})	Resposta	Referência
***Dunaliella tertiolecta,Cylindrotheca closterium, Nitzschia*sp.**	Monitoramento da fonte de N	120	Aumento nos ácidos graxos insaturados *D. tertiolecta* (62,08%), *C. closterium* (61,65%), *Nitzschia* sp. (60,47%)	CONVERTI *et al.* (2015)
Dunaliella tertiolecta	Limitação de nitrogênio	40	Aumento em 5 vezes na fluorescência lipídica	CHEN *et al.* (2011)
Chlamydomonas reinhardtii, Scenedesmus subspicatus	Mudanças na concentração de NO_3	150	O conteúdo de lipídios totais foi 40% maior na concentração N-intermediária	DEAN *et al.* (2010)
***Scenedesmus* sp.**	Combinação de limitação de nitrogênio e fósforo	60	Aumento nos lipídios totais em 30% e 53%	XIN *et al.* (2010)
***Chlorella* sp.**	Limitação de nitrogênio e fósforo	216	Produção de lipídios de 53,96 ± 0,63 mg/L/d	PRAVEENKUMAR *et al.* (2009)
Chlorella vulgaris	Monitoramento da fonte de N	30	Aumento de lipídios em 7 dias (26,71%) e 20 dias (29,53%)	WIDJAJA *et al.,* (2009)
Neochloris oleoabundans	Mudanças na concentração de $NaNO_3$	360	Maior produção lipídica 0,133 g/L/d, tratamento com 10 mM de $NaNO_3$	LI *et al.* (2008)
Chlorella vulgaris		76	40% de incremento em lipídios totais nas concentrações menores de N	ILLMAN *et al.* (2000)

As diferentes intensidades de luz e comprimentos de onda podem alterar o metabolismo lipídico em microalgas. Tipicamente, uma baixa intensidade da luz induz à formação de lipídios polares, em particular lipídios de membrana que são associadas com o cloroplasto, enquanto que a alta intensidade de luz diminui o teor total de lipídios polares, aumentando simultaneamente a quantidade de lipídios de armazenamento, principalmente TAGs (KHOTIMCHENKO & YAKOVLEVA, 2005; SNIDER *et al.,* 2006).

Na literatura são encontrados diversos estudos sobre a influência da intensidade luminosa no acúmulo de lipídios e os perfis que eles apresentam. A Tabela 3 apresenta a variação do perfil lipídico em função de diferentes condições de estresse às quais foram submetidas algumas espécies de microalgas.

Tabela 3. Mudanças no conteúdo lipídico em microalgas submetidas a diferentes condições luminosas.

Microalga	Tipo de radiação	Tratamento	Perfil lipídico	Referencia
Tichocarpus crinitus	Baixa intensidade luminosa	8-10% luz PAR	Incremento em TAG	KHOTIMCHENKO & YAKOVLEVA(2005)
Pavlova lutheri	Alta intensidade luminosa	100 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}	Incremento em lipídeos totais	CARVALHO & MALCATA (2005)
Nannochloropsis oculata	UV-A	24W.m^{-2}(320–400nm) + PAR (60 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1})	Aumento dos PUFA e lipídios estruturais	SRINIVAS & OCHS (2012)
Phaeodactylum tricornutum	Radiação UV	PAR (60 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) + UVA (2,76; 8,22; 13,73W.m^{-2}) + (0,19; 1,04 W.m^{-2}) UVB	Aumento de EPA e PUFA	LIANG *et al.*(2006)
Nannochloropsis sp.	UV-A	UV-A (320– 400 nm)+ 140 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}	Incremento nos PUFA	FORJÁN *et al.* (2011)

PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados, TAG: Ácidos triglicerídeos, UV: ultravioleta, PAR: radiação fotossinteticamente ativa.

A intensidade luminosa, além de influenciar a produção de lipídios em condições de escassez nutricional, pode estimulara produção de radicais livres. Por este motivo, as microalgas têm desenvolvido mecanismos de proteção diante dos

fatores adversos, estimulando a produção de moléculas antioxidantes (INGRIDY, 2011).

3.3.3. Aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs)

As microalgas verdes, em sua maioria, produzem ² -carotenos como resposta a estresse por intensidades luminosas (DERNER, 2006). Outras moléculas que têm sido identificadas em diversas espécies de microalgas, em resposta a estresse por radiação UV são os MAAs, algumas com propriedade antioxidante e anti-inflamatória como a micosporina-glicina (SUNG-SUK *et al.*, 2012). O papel fotoprotetor tem sido analisado em detalhe por diversos pesquisadores, também tem se observado uma relação entre o conteúdo de MAAs com a disponibilidade de nitrogênio inorgânico (KORBEE *et al.*, 2016).

3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MICROALGAS

O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante em microalgas surgiu no Japão, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição àqueles antioxidantes sintéticos utilizados, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), os quais mostraram efeitos carcinogênicos (DUTRA *et al.,* 2007).

Entre as moléculas que apresentam atividade antioxidante podemos mencionar alguns compostos nitrogenados como alcaloides, aminoácido, peptídeos, aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) e derivados de clorofila. Adicionalmente, as microalgas produzem compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos; existem também os diversos carotenoides e tocoferóis (TIRZITIS, 2010). Na Tabela 4 mostra-se alguns ensaios de atividade antioxidante medidos em diferentes espécies de microalgas.

Tabela 4. Espécies de microalgas que mostraram atividade antioxidante mediante diversos ensaios.

Microalga	Intensidade (µmol fótons $m^{-2}s^{-1}$)	Ensaio AOX	Eq. Padrão	Resposta	Referência
Tetraselmis sp., *Nannochloropsis gaditana,* *Dunaliella salina,* *Chlorella sp.,* *Navicula sp.*	150	Folin-Ciocalteu	BHT, Vitamina C (ascórbico ácido)	Presença de fenóis	ANAL *et al.* (2015)
Golenkinia radiata	150	ABTS, DPPH	Ácido gálico e Trolox	Avaliação da capacidade antioxidante	SASSI *et al.* (2015)
Tetraselmis suecica, *Chlorella vulgaris.*	125	TEAC, ABTS	Trolox; ácido gálico	Presença de ² -caroteno	KOEN *et al.* (2015)
		Folin-Ciocalteu	Vitamina C e E	Presença de compostos fenólicos	
Nostoc muscorum, *Chlorella vulgaris,* *Oscillatoria* sp.	40	DPPH, ABTS	BHT	Avaliação da capacidade antioxidante	SANAA *et al.* (2013)
Chlorella vulgaris *Haematococcus pluvialis,* *Scenedesmus maximus,* *Desmodesmus pleiomorphus*	35	ABTS	Ácido gálico	Avaliação da capacidade antioxidante	GUEDES *et al.* (2013)

AOX: atividade antioxidante, DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, TEAC: Capacidade antioxidante em Equivalente Trolox**,** ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), BHA:butil hidroxianisol, BTH: hidroxitolueno butilado.

3.5. *Desmodesmus* sp.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi escolhida a microalga *Desmodesmus* como modelo biológico de estúdio para a determinação da fração glicérica e potencial antioxidante como resposta às modificações na concentração de nitrogênio no meio e intensidade de PAR.

O gênero *Desmodesmus*, anteriormente *Scenedesmus,* tem sido objeto de pesquisa há quase 200 anos. Espécies que apresentam espinhos são classificadas como*Desmodesmus* e aquelas sem espinhos *Scenedesmus* (GORDINHO, 2009). Seguindo a sinopse da *AlgaeBase*, o gênero *Desmodesmus* faz parte da Família Scenedesmaceae, dentro da Ordem Sphaeropleales:

Reino Plantae
Filo Chlorophyta
Classe Chlorophyceae
Ordem Sphaeropleales
Família Scenedesmaceae
Subfamília Desmodesmoideae

Este gênero se caracteriza por ter colônias planas, com células unidas pelo costado lateral, formando filamentos com 2, 4 ou 8 células ou ainda sendo unicelulares (Figura 3). As células podem ser ovoides ou elípticas, com ápices redondos, com espinhos. A parede celular é granulada, espinhosa ou dentada (MORESCO, 2007). Espécies de *Desmodesmus* são extremamente comuns em águas continentais do mundo inteiro (JOHNSON *et al.,* 2007).

Figura 3 -*Desmodesmus opoliensis (P. Richer) E. Hegewald.* Fonte: The Japanese Fresh-water Algae(1977).

Embora no Brasil existem registros de espécies como *Desmodesmus brasiliensis*(Bohlin) (HEGEWALD, 2000), os estudos taxonômicos no país são relativamente poucos e somente têm registros nos estados de São Paulo, Pará, Goiás, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Espírito Santo (SOUZA, 2013). A primeira citação de coleta de espécies de microalgas na Bahia foi realizada por MENDES e*t al.*(2012), com apenas uma espécie de *Desmodesmus*, tornando-se evidente a necessidade da ampliação de coleções na região nordeste, além de pesquisas e exploração das características dessas espécies (MENDES *et al.,* 2012).

O gênero *Desmodesmus* consegue acumular porcentagens maiores que 21% de lipídios dentro da célula como resposta à deficiência de nutrientes no meio de cultivo (PAN *et al.,* 2011; SAMORI *et al.,* 2013). Uma das vantagens deste gênero é a sua alta produtividade, já que atinge o máximo do crescimento em até 14 dias, quando comparado com outras microalgas oleaginosas, por exemplo, *Botryococcus braunii* que demora até 38 dias para atingir sua máxima quantidade de células no meio (MENDOZA-ESPINOSA & STEPHENSON, 2010).

Adicionalmente, KENT *et al.*(2015) relataram que *Scenedesmus* sp. possui propriedades nutricionais que podem ser comparadas com *Chlorella* e S*pirulina*, espécies já utilizadas comercialmente devido ao seu grande conteúdo de carboidratos, lipídios, proteínas e pigmentos. *Desmodesmus* poderia ser introduzida no mercado de forma semelhante às microalgas e cianobactérias mencionadas anteriormente, se cultivadas em condições propícias à produção de tais componentes nutricionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O material de estudo pertence à Coleção de Microalgas do Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC) da Universidade Federal da Bahia.A cultura foi isolada do Dique de Tororó (12°59’04”S - 38°30’21”W), município de Salvador-BA, Brasil (Figura 4), em agosto de 2012. Sua identidade específica ainda não foi confirmada, por isso, será tratada neste estudo como *Desmodesmus* sp.

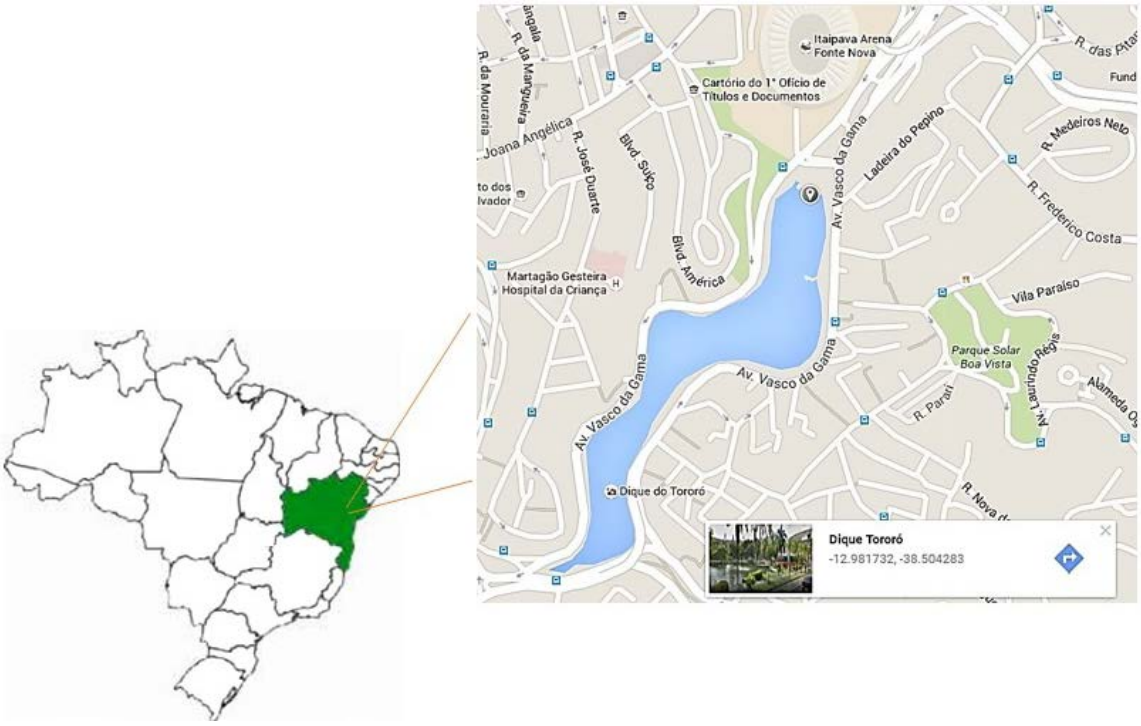


Figura 4 - Localização do Dique de Tororó, Salvador-BA, Brasil, local de procedência do material.

O cultivo de *Desmosdemus* sp. é mantido na coleção em câmaras de ambiente controlado tipo B.O.D. sob condições controladas de 25 ± 2ºC, regime de 24 h de radiação fotossinteticamente ativa (PAR; 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) e meio BBM (do inglês *Bold’s Basal Medium*) modificado, cuja composição é detalhada nas Tabelas 5, 6 e 7. O meio BBM modificado tem seu pH ajustado para 6,8 e posteriormente é autoclavado para garantir sua esterilização.

Tabela 5. Principais componentes que constituem o meio BBM, com modificações.

Estoque	Solução estoque	mL/L
1. KH_2PO_4	8,75 g/500 mL	10
2. $CaCl_2.2H_2O$	12,5 g/500 mL	1
3. $MgSO_4.7H_2O$	37,5 g/500 mL	1
4. $NaNO_3$	125 g/500 mL	1
5. K_2HPO_4	37,5 g/500 mL	1
6. NaCl	12,5 g/500 mL	1
7. $Na_2EDTA.\ 2H_2O$	10 g/L	1
KOH	6,2 g/L	
8. $FeSO_4.7H_2O$	4,98 g/L	1
H_2SO_4(concentrado)	1 mL/L	1
9. Solução de metais traço	Ver Tabela 6	1
10. H_3BO_3	5,75 g/500 mL	0,7
11. F/2 solução de vitaminas (opcional)	Ver Tabela 7	1

Tabela 6. Composição da solução de metais traço do meio BBM.

Substância	g/L
1. H_3BO_3	2,86
2. $MnCl_2.4H_2O$	1,81
3. $ZnSO_4.7H_2O$	0,222
4. $Na_2MoO_4.2H_2O$	0,390
5. $CuSO_4.5H_2O$	0,079
6. $Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,0494

Tabela 7. Composição de F/2 solução de vitaminas.

Substância	Estoque primário (g/L)	Estoque concentrado (g/L)	Concentração final do meio (mg/L)
1. Vitamina B12 (cianocobalamina)	0,001	0,0001	0,001
2. Biotina	0,001	0,0001	0,001
3. Tiamina	0,200	0,0200	0,200

4.1. RE-ISOLAMENTO CLONAL E CULTIVO AXÊNICO DE *Desmodesmus* sp.

A cepa registrada como *Desmodesmus* sp. 07/agosto/2014 BBM, procedente da Coleção de Microalgas do LABEC, foi verificada no que se refere ao seu grau de contaminação por microrganismos (ex. bactérias e cianobactérias) a partir de alíquotas observadas em microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus, EUA). Após a confirmação da presença de contaminação com leveduras, realizou-se o procedimento de re-isolamento clonal baseado na metodologia de

SUREK&MELKONIAN (2004), mostrado de forma resumida na Figura 5 e descrita em detalhe no ANEXO I.

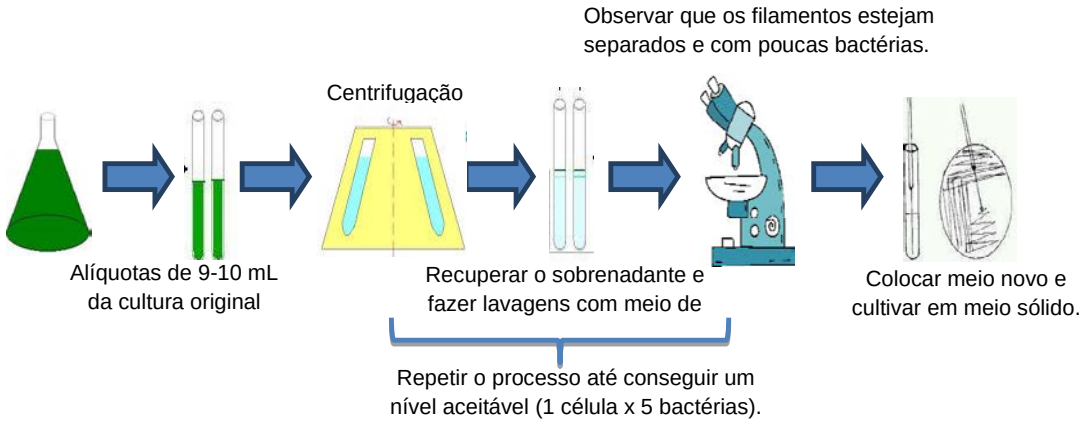


Figura 5 - Metodologia para o re-isolamento da microalga *Desmodesmus* sp.

A partir da semeadura em placa de Petri, após a visualização do crescimento das colônias de microalgas, coletou-se uma das colônias com ajuda de uma alça esterilizada, colocou-se em 10 mL de meio líquido BBM e cultivou-se em câmaras de ambiente controlado tipo B.O.D.para começar a produção de biomassa asséptica. Este procedimento foi realizado em duplicata para garantir a existência de material disponível caso exista algum tipo de contaminação.

Após do protocolo de re-isolamento clonal da cultura de *Desmodesmus* sp. continuou-se com a aclimatação e produção de biomassa em quantidade suficiente para os experimentos subsequentes.

4.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A partir da cultura em meio líquido BBM descrito acima, procedeu-se com a produção de biomassa em maior escala. A inoculação realizou-se em concentração de 10% v/v, como se mostra na Figura 6, para um volume total de 100 mL de meio BBM e cultivando-se durante sete dias em 25 ± 2ºC e regime de 24 h sob irradiância de 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}de PAR.

Uma vez que a cultura de 100 mL atingiu uma concentração favorável (2-5 X 10^6 células.mL^{-1}) (FAO, 1987), realizou-se a próxima inoculação em duplicata,

respeitando a proporção de cultivo de 1/10 para um volume total de 500 mL de meio BBM (Figura 8). A partir desse volume de cultivo, as culturas foram areadas mediante bombas de aquário (Sunsun HP-400) e cultivadas em condições de 25 ± 2°C, com ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão e irradiância de 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} proporcionada por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (75 W). O cultivo foi monitorado por microscopia óptica para verificar qual das culturas encontrava-se em melhor estado, avaliando a quantidade de células, a coloração e o tamanho das*Desmodesmus.* O cultivo de 500 mL que apresentava o melhor estado foi escolhido para realizar um inóculo em 1.000 mL de meio BBM (razão de 1/4). O crescimento foi acompanhado durante sete dias e a contagem final do número de células foi realizada antes de começar os experimentos. O cultivo de 1.000 mL foi utilizado como inóculo (cultivo mãe) para as duas bateladas de experimentos.

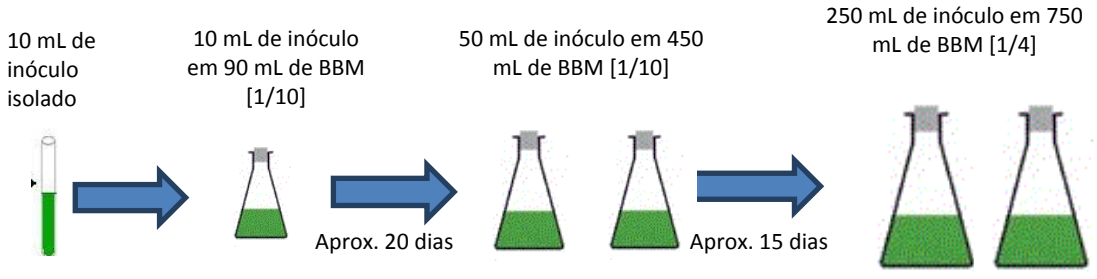


Figura 6 - Representação da metodologia para a produção de biomassa de *Desmodesmus* sp.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de avaliar dois fatores simultaneamente, intensidade de luz (PAR) e concentração de nitrato, foi elaborado um experimento fatorial de dois fatores (luz e nitrato) e em dois níveis para cada fator (luz: 80 e 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e nitrato: 250 e 500 mg.L^{-1}). Cada um dos tratamentos foi realizado com cinco réplicas. A Tabela 8 resume a combinação do delineamento experimental dos quatro tratamentos e as abreviaturas usadas para se referir a cada tratamento. O primeiro valor representa a intensidade luminosa (80 ou 200) e o segundo valor após o ponto representa a concentração de nitrato (250 ou 500).

Tabela 8. Combinação dos fatores e níveis dos fatores que representam os quatro tratamentos deste estudo.

	Quantidade de $NaNO_3$ ($mg.L^{-1}$)	
Intensidade de PAR (μmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$)	250	500
80	**80.250**	**80.500**
200	**200.250**	**200.500**

A partir do cultivo mãe foram inoculados 20 frascos Erlenmeyer de 250 mL com 10 mL do inóculo para um volume total de 100 mL de meio BBM [10% (v/v)]. Os cultivos foram mantidos em câmara de fotoperíodo a 25 ± 2°C, ciclo de iluminação de 12/12 horas luz/escuro e aeração com bombas de aquário. A irradiância foi proporcionada por lâmpadas tubulares fluorescentes (Golden led Lamp 5W, equivalente a 40W luz do dia incandescente) e o nitrato foi fornecido na forma de $NaNO_3$.

Foram realizados dois experimentos, a primeira batelada de experimentosteve como finalidade obter a curva de crescimento e definir as fases de crescimento das culturas. Ao longo de 29 dias de experimento a contagem de células realizou-se de dois em dois dias. Ao finalizar o período experimental, coletou-se a biomassa mediante centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf 5702) e as amostras mantiveram-se a -8°C até sua liofilização. As amostras correspondentes a este experimento foram denominadas acrescentando-se a letra **L** (laranja, devido à mudança de coloração do cultivo) à nomenclatura definida na Tabela 8.A partir da primeira batelada de experimentos foi possível determinar o tempo necessário para chegar à fase estacionária, sendo esta estabelecida em 14 dias.

Dessa forma, a segunda batelada de experimentos foi realizada em período de 14 dias sob as mesmas condições do primeiro experimento. O crescimento avaliou-se periodicamente e a coletada biomassa foi realizada no dia 14° com objetivo de determinar a quantidade de clorofilas, glicerídeos, potencial antioxidante e aminoácidos do tipo micosporinas. Essas amostras receberam a letra **V** (verde, devido à aparência do cultivo) aliada à nomenclatura definida na Tabela 8e foi considerada uma concentração celular inicial de aproximadamente 8 X 10^4 cél.mL^{-1}, em um volume total de 200 mL de meio. Todas as amostras foram mantidas congeladas a -8°C até o dia da liofilização.

4.4. TAXA DE CRESCIMENTO

A taxa de crescimento foi avaliada mediante a contagem de células, utilizando uma câmera de Neubauer e seguindo a metodologia descrita pela FAO (1987). Dependendo da densidade da amostra, foi necessário diluí-la para possibilitar sua contagem. Para preencher as laterais da câmera de Neubauer, foram pipetadas 10 µL de cada lado da câmera, no Anexo II se amostra um esquema geral da câmara de Neubauer, marcando como câmara de contagem o local preenchido com a amostra líquida. O material foi observado no microscópio óptico nos aumentos de 10X ou 40X e a contagem foi feita de células individuais.

Após a contagem de células em cada um dos quadrantes da câmera de Neubauer, o cálculo do número de células.mL^{-1} realizou-se seguindo a equação (a) adaptada de FAO (1987):

$$No.\,de\ Células.mL = (PC)(NP)(FD)(1.000) \qquad \text{Eq. (a)}$$

Onde: PC = Profundidade da câmera (0,1mm).

NP = Média do número de células na amostra, contadas nas grades.

FD= Fator de diluição.

O cálculo é multiplicado por 1.000 para converter a mililitros.

Para o cálculo do FD, é considerada a equação (b):

$$F.D. = \frac{m+f}{m} \qquad \text{Eq. (b)}$$

Onde: m = Volume da amostra (mL).

f = Volume de água adicionada para diluir a amostra (mL).

As curvas de crescimento foram elaboradas com base no número de células por volume (mL), identificando-se as três fases iniciais de crescimento.

Além de construir as curvas, foram calculadas as taxas de crescimento (μ) e as taxas de replicação (k), usando as equações (c)e(d), respectivamente, adaptadas de WAHIDIN*et al.* (2013):

$$velocidade\ de\ crescimento\ (\mu)\ \frac{Ln(N2-N1)}{t2-t1} \qquad \text{Eq. (c)}$$

Onde: N1 = número de células no tempo 1 (t1) inicial; N2= número de células no tempo 2 (t2) final.

$$\textit{Replicação celular (k)}\ \text{dia}^{-1} \qquad \mathbf{k = \mu / Ln\,2} \qquad \text{Eq. (d)}$$

Para a segunda batelada de experimentos, além da contagem de células e os cálculos de velocidade de crescimento e replicação, foi avaliada a densidade ótica mediante técnica espectrofotométrica para monitoramento do crescimento. Utilizando o espectrofotômetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies) se determinou a concentração celular da amostra por absorbância baseada em RIBEIRO (2011). A calibragem do equipamento realizou-se com água, seguida de uma varredura nos comprimentos de onda da luz visível de uma amostra qualquer, a fim de determinar o comprimento de onda de maior absorbância, no qual se realizarão todas as leituras. Para as amostras de *Desmodesmus* sp. o pico maior apareceu em 685nm.

4.5. QUANTIDADE DE CLOROFILAS *a* E *b*

Para avaliar as concentrações de clorofilas *a* e *b* utilizou-se a técnica por espectrometria de acordo com MOHD NUR (2014). Alíquotas de 25 mL de amostra da cultura de cada um dos tratamentos foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Ao precipitado foram adicionados 5 mL de acetona 90% (v/v), agitado em vórtice durante 10 minutos e recuperando-se o sobrenadante. A leitura das absorbâncias do branco (acetona 90%) e dos sobrenadantes das amostras foi realizada nos comprimentos de onda de 664 nm e 647 nm, utilizando o espectrofotômetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies). Os cálculos foram efetuados conforme as equações (e) e (f) de JEFFREY& HUMPHREY (1975):

$$\text{Clorofila } a\ [\text{mg.L}^{-1}] = 11{,}93\ X\ Abs_{664} - 1{,}93\ X\ Abs_{647} \qquad \text{Eq. (e)}$$

$$\text{Clorofila } b\ [\text{mg.L}^{-1}] = 20{,}36\ X\ Abs_{647} - 5{,}5\ X\ Abs_{664} \qquad \text{Eq. (f)}$$

Onde Abs_{664} corresponde à absorbância no comprimento de onda de 664 nm e Abs_{647} à absorbância em 647 nm.

Após determinação das clorofilas, o volume restante de amostra foi concentrado mediante centrifugação e guardado em freezer a -8°C para posterior liofilização.

4.6.GLICERÍDEOS TOTAIS

Para a quantificação deglicerídeos totais dos diferentes tratamentos foi seguida a metodologia de extração de ácidos graxos e o método cromatográfico GC-FID utilizado no LABEC, descrito no ANEXO III. Acurva de calibração foi realizada com um padrão Mix com 40mg (25%mono, 50%di- 25%triglicerídeos) e usando metil-heptadecanoato (MHD) como padrão interno para todas as corridas.

4.6.1 Determinação da quantidade de glicerídeos totais

A quantificação de glicerídeos nos tratamentos foi realizada com uma curva de calibração. Para o cálculo do percentual (m/m) da quantidade de mono, di e triglicerídeos presentes nas amostras, foi utilizada a equação (g) adaptada de PELISSON (2012):

$$G = \left[a\left(\frac{Ag}{Api}\right) + b\right] Mpi\left(\frac{100}{m}\right) \qquad \text{Eq. (g)}$$

Onde G é o conteúdo em porcentagem (m/m) dos glicerídeos individuais na amostra; Ag a área do pico dos glicerídeos individuais (obtidas mediante o software COMPAS CCD); Api a área do pico do padrão interno; Mpi a massa do padrão interno em mg; m a massa da amostra em mg; ± a inclinação (coeficiente angular) da função de calibração dos MAGs, DAGs e TAGs; e *b* é o intercepto (coeficiente linear) da função de calibração.

4.7. POTENCIAL ANTIOXIDANTE

4.7.1. Procedimento de extração das amostras

As análises de ação antioxidante foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Fungyi Chow no Laboratório de Algas Marinhas Édison José de Paula (LAM) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O potencial antioxidante foi determinado a partir de amostras liofilizadas (30 mg massa liofilizada, ML) das culturas **V** e **L**. O material foi triturado em nitrogênio líquido e extraído em 600 µL de metanol durante 3 h a temperatura ambiente e protegido da luz, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 15 min e temperatura ambiente. O

sobrenadante foi recolhido em um microtubo e guardado em geladeira (4°C), protegido da luz, até posterior ensaio do potencial antioxidante. As análises foram avaliadas em espectrofotômetro UV-visível para microplacas de 96 poços (Epoch Biotek, EUA) mediante três diferentes ensaios: a) captura do radical livre ABTS (2,2–azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), b) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e c) poder de redução do ferro (FRAP). Cada um dos ensaios de potencial antioxidante foi avaliado na concentração de 15 $mg.mL^{-1}$ de extrato bruto de amostras de *Desmodesmus* sp., tratadas sob diferentes condições de luz e nutrientes. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) e equivalente padrão por massa de amostra liofilizada ($\mu g.mg^{-1}$). Para os cálculos de equivalente padrão foram realizadas curvas de calibração com os padrões ácido gálico, trolox, quercetina e BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol), todos da Sigma (EUA).

4.7.2. Captura do radical livre ABTS

O ensaio da captura do radical livre ABTS foi baseado nos métodos de RUFINO *et al.* (2007) e YANG *et al.* (2011), e modificado no LAM por TORRES *et al.* (em elaboração). O método antioxidante total pela captura (sequestro) do radical livre ABTS pode estimar a ação antioxidante de substâncias de natureza hidrofílica e lipofílica (RUFINO *et al.*, 2007). A partir da mistura da solução reativa de ABTS mais a amostra e incubação por 20 min em temperatura ambiente, protegido da luz, foi determinada a absorbância da reação em espectrofotômetro UV-visível para microplacas no comprimento de onda de 734 nm. O percentual de atividade antioxidante (%AAO) foi calculado usando os valores de absorbância de cada amostra e, junto com as curvas padrões de ácido gálico (0 – 0,45 µg), trolox (0 – 1,5 µg), quercetina (0 – 1,5 µg) e BHA (0 – 1,5 µg) foram calculados os equivalentes para os respectivos padrões.

4.7.3. Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu

A avaliação da capacidade redutora dos extratos de *Desmodesmus* sp. foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu, seguindo SINGLETON & ROSSI (1965) e WATERMAN & MOLE (1994) e modificado no LAM (PIRES *et al.*, em preparação). Este ensaio baseia-se na propriedade redutorada mistura, principalmente devido à presença de substâncias fenólicas. A partir da mistura de água ultrapura, amostra, reagente de Folin Ciocalteu e solução de Na_2CO_3 saturada e incubação por 30 min

em temperatura ambiente, protegido da luz, foi determinada a absorbância da reação em espectrofotômetro UV-visível para microplacas no comprimento de onda de 760 nm. A %AAO foi calculada usando os valores de absorbância de cada amostra e, junto com as curvas padrões de ácido gálico (0 – 3,6 µg), trolox (0 – 18 µg), quercetina (0 – 6 µg) e BHA (0 – 22,5 µg) foram estimados os equivalentes para os respectivos padrões.

4.7.4. Ensaio da redução do ferro - FRAP

Esta metodologia foi realizada através do ensaio do potencial de redução do ferro, baseada no método de RUFINO *et al.* (2006) e modificado no LAM (URREA-VICTORIA *et al.*, em preparação). A mudança na absorbância no método FRAP está diretamente relacionada com o poder redutor total dos antioxidantes doadores de elétrons, presentes na mistura de reação (TANDON *et al*., 2008). Em pH ácido, o complexo tripiridil hidrazina férrica (Fe^{3+} TPTZ) se reduz (produzindo intensa cor azul) que pode ser monitorada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A partir da mistura de água ultrapura, amostra e solução reativa de FRAP e incubação por 30 min a 37°C, protegido da luz, a absorbância da reação foi determinada em espectrofotômetro UV-visível para microplacas no comprimento de onda de 595 nm. A %AAO foi calculada usando os valores de absorbância de cada amostra e, junto com as curvas padrões de ácido gálico (0 – 3,6 µg), trolox (0 – 18 µg), quercetina (0 – 6 µg) e BHA (0 – 22,5 µg) foram calculados os equivalentes para os respectivos padrões.

4.8. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs)

O material liofilizado (aproximadamente 200 mg) e triturado em nitrogênio líquido foi extraído em 1 mL de metanol 25% (v/v), a 45°C durante 2 h seguindo a metodologia de TARTAROTTI & SOMMARUGA (2002). Seguido de uma centrifugação por 10 min a 12.000 rpm e temperatura ambiente, o sobrenadante foi recuperado para um novo microtubo. Este procedimento de extraçãofoi repetido mais duas vezes, os sobrenadantes das três extrações foram reunidos em um único microtubo e logo foi seco em centrífuga a vácuo (speed-vacuum).

Para a análise qualitativa das MAAs em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE analítico 1260 Agilent) foi realizada a ressuspensão da amostra na concentração de 1 mg de extrato em 1 mL de metanol grau CLAE. A injeção das

amostras foi feita seguindo a metodologia reportada por Torres (2015), no cromatógrafo analítico 1260, fase reversa com coluna ZORBAX SB-C18, fluxo 0,3 $mL.min^{-1}$, solventes mantidos socraticamente durante 15 minutos nas concentrações 90% de ácido acético ao 0,1%, e 10% de acetonitrila; a temperatura durante toda a corrida foi mantida a 45°C. A detecção das MAAs foi mediante luz UV-visível (»= 270, 300, 330, 350 nm).

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância (ANOVA) foi usada para verificar a existência de diferencias significativa entre as médias das variáveis analisadas. A partir da determinação das diferencias, foi empregado um pós-teste de Turkey para identificar quais tratamentos possuem comportamento distinto para cada variável. Todas as análises tiveram um nível de significância (±) fixado em 5% e foram realizadas no software Minitab® 16, considerando-se cinco réplicas para cada tratamento.

5. RESULTADOS

5.1. RE-ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DA CULTURA *Desmodesmus* sp.

A cepa *Desmodesmus* sp. 07/agosto/2014 BBM foi re-isolada com sucesso após semeaduras em meio sólido BBM em placa de Petri (Figura 7A) e em tubo de ensaio (Figura 7B). A etapa de isolamento demorou aproximadamente três semanas, já que as primeiras placas apresentaram contaminação com levedura. Após a obtenção de cultura axênica, procedeu-se com a produção de biomassa para os experimentos.

Figura 7 - Culturas assépticas de *Desmodesmus* sp. (07/agosto/2014 BBM) cultivadas em meio sólido BBM. A) Semeadura em placa de Petri e B) Semeadura em tubos de vidro.

5.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A produção de biomassa foi realizada com sucesso, com crescimento axênico de *Desmodesmus* sp. em 10 mL de meio líquido BBM com seis dias após de ter inoculado uma única colônia procedente da placa de Petri (Figura 8a) e após 15 dias de crescimento (Figura 8b), assim como em volume de 100 mL (Figura 8c) e 1 L (Figura 8d).

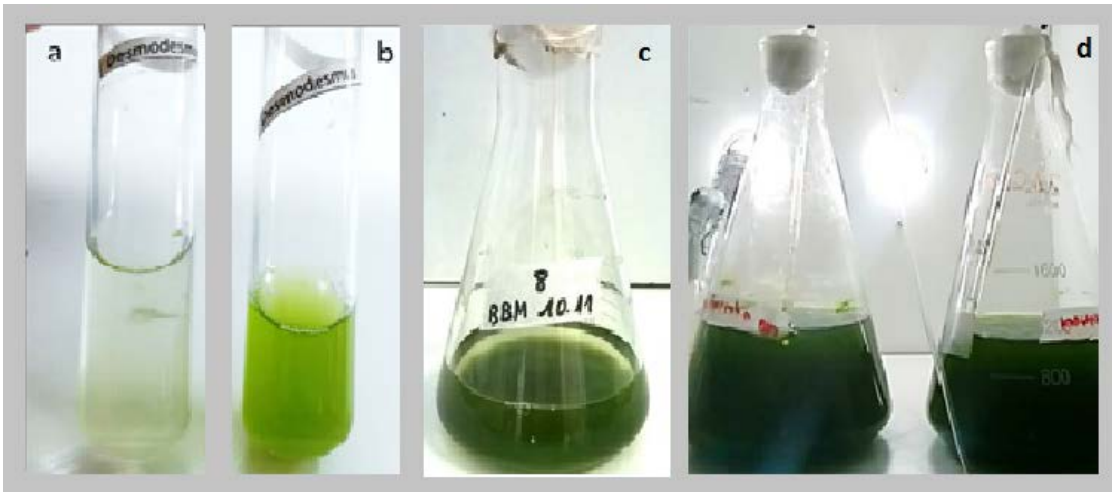


Figura 8- *Desmodesmus* sp. em meio líquido BBM.a) 6 e b) 15 dias após o inóculo, c) Segunda etapa da produção de biomassa em volumem de 100 mL, d) Última etapa da produção de biomassa em volume de 1000 mL (cultura mãe).

5.3. TAXA DE CRESCIMENTO

A construção das curvas de crescimento para *Desmodesmus* sp. foi realizada a partir da primeira batelada de experimentos que teve duração de 29 dias (experimento L, coloração laranja). A Figura 9mostra a dinâmica das curvas de crescimento para todos os tratamentos. Culturas com menor quantidade de nitrato L-80.250 (Figura 9A) e L-200.250 (Figura 9C), independente da intensidade luminosa, entraram em fase estacionária oito dias após a inoculação; diferentemente daquelas culturas com 500 $mg.L^{-1}$ $NaNO_3$, Figuras 9B e 9D, que se mantiveram na fase de crescimento ativo até o 18º dia. A dinâmica de crescimento do cultivo não mostrou diferenças entre os tratamentos de intensidade luminosa. É importante observar que nas culturas com maior concentração de nitrato houve uma queda mais pronunciada na taxa de crescimento; apresentando uma fase estacionária curta, entrando logo na fase de declínio.

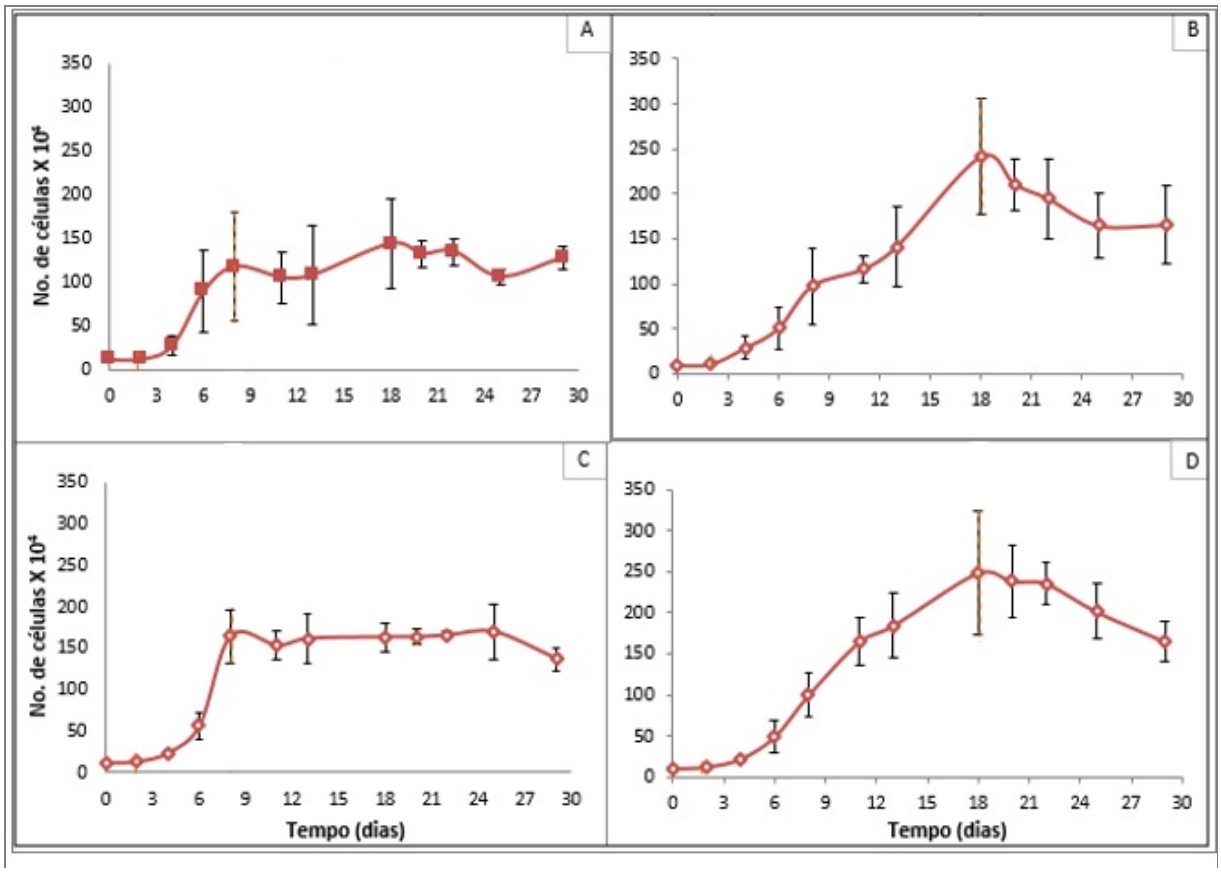


Figura 9. Curvas de crescimento de *Desmodesmus* sp. L baseado no Número de células durante 29 dias em diferentes condições: A) L.80-250; B) L-80.500; C) L-200.250; D) L-200.500. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5).

A velocidade média de crescimento para todos os tratamentos é mostrada na Tabela 9 e a taxa de replicação na Tabela 10. É possível observar que a velocidade de crescimento da fase de latência é similar em todos os tratamentos em que a concentração celular inicial se manteve próxima em todas elas. A fase de crescimento (fase exponencial) começou no segundo dia após a inoculação para todos os tratamentos (como foi observado na Figura 9) as culturas mostraram velocidades de crescimento similares para os tratamentos com a mesma quantidade de nitrato, sendo maiores naqueles tratamentos com 250 $mg.L^{-1}$ de $NaNO_3$(aproximadamente 2,3 células.dia^{-1}), estas culturas alcançaram sua fase estacionaria no 8° dia após ter sido inoculadas, por outro lado as culturas com 500 $mg.L^{-1}$ de $NaNO_3$, entraram na fase estacionaria no 18° dia de ter sido inoculadas, apresentando valores de 0,92 células.dia^{-1}; estes mesmos tratamentos mostram valores negativos na fase estacionaria, por outro lado as culturas L-80.250 e L-200.250 mostraram taxas de crescimento pouco significativas (0,5 células.dia^{-1}) em

dita fase. A taxa de replicação das culturas mostraram um comportamento similar à velocidade crescimento, em resposta às concentrações de nitrogênio.

Tabela 9.Velocidades de crescimento (No. células.dia^{-1}) nas diferentes fases da cultura de *Desmodesmus* sp. submetida aos diferentes tratamentos.

Fases de crescimento	**L-80.250**	**L-80.500**	**L-200.250**	**L-200.500**
Latência	4,25	4,73	4,84	4,89
Exponencial	2,31	0,92	2,35	0,92
Estacionária	0,55	-1,23	0,58	-1,19

Tabela 10.Velocidades de replicação celular (k).dia^{-1} nas diferentes fases da cultura de *Desmodesmus* sp. submetida aos diferentes tratamentos.

Fases de crescimento	**L-80.250**	**L-80.500**	**L-200.250**	**L-200.500**
Latência	6,14	6,82	6,99	7,06
Exponencial	3,33	1,33	3,39	1,32
Estacionária	0,79	-1,78	0,84	-1,72

Após 29 dias de ter sido inoculadas, as culturas apresentaram mudança na coloração, passando da cor verde característica de *Desmodesmus* sp, para verde-amarelo nos tratamentos L-80.250 e L-80.500 e os tratamentos expostos à maior intensidade luminosa (L-200.250 e L-200.500) viraram para uma cor mais alaranjada, estas mudanças se mostram na Figura 10, respectivamente.

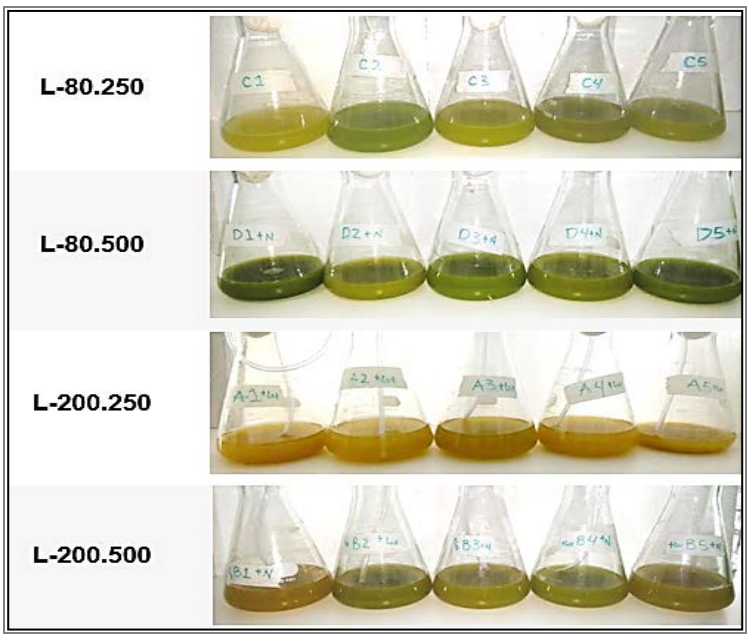


Figura 10- Culturas de *Desmodesmus* sp. mostrando mudança na coloração após 29 dias de inoculação nos diferentes tratamentos.

Os resultados das curvas de crescimento da segunda batelada de experimentos, que teve duração de 14 dias (experimento V) são mostrados na Figura 11.

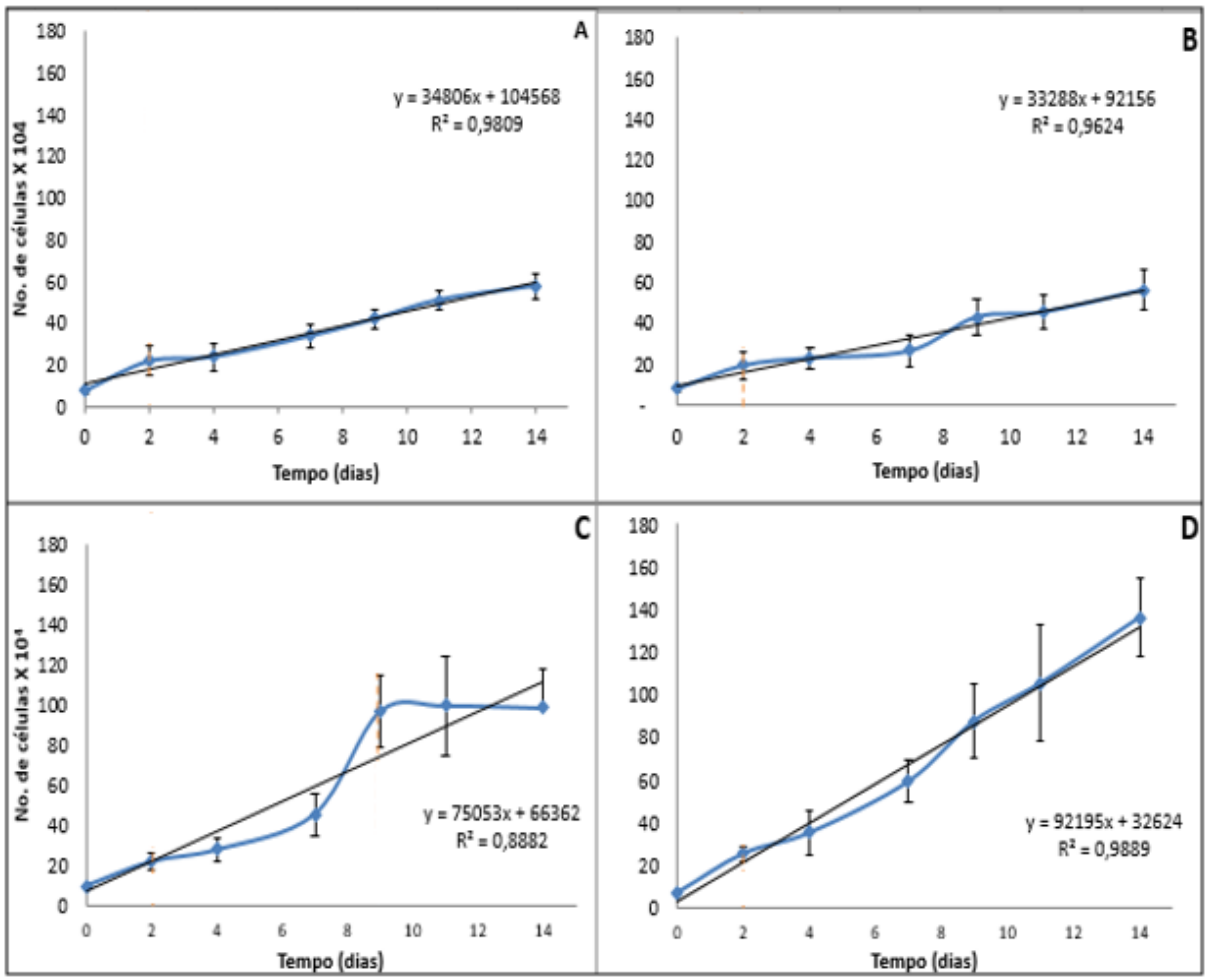


Figura 11 - Curvas de crescimento de *Desmodesmus* sp. baseado no Número de células durante 14 dias em diferentes condições: A) V-80.250; B) V-80.500; C) V-200.250; D) V-200.500. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5).

Para os tratamentos deste experimento não foram calculadas as taxas de crescimento na fase estacionária, já que somente o tratamento V-200.250 entrou nesta fase no nono dia após de ter sido inoculado, além disso se considerou que a fase exponencial começou no segundo dia após ter sido inoculada, pois não se fizeram contagens nos dias anteriores, mas é conhecido que todas as culturas possuem esta fase, pelo que os valores são apresentados na Tabela 11. A cultura V-200.250 apresentou a velocidade de crescimento maior durante a fase exponencial

com 1,93 células.dia^{-1}, seguida pelo tratamento V-200.500 com 1,16 células.dia^{-1}, pelo que poderia se afirmar que esta segunda batelada, mostraram maiores velocidades de crescimento quando submetidas a maior intensidade luminosa.

A velocidade de replicação também foi calculada para estes tratamentos. Os valores apresentados na Tabela 12, mostrando que o tratamento V-200.500 apresentou a maior taxa de replicação durante a fase de latência, mas durante a fase exponencial, o tratamento V-200.250 mostrou a maior taxa de replicação com 1,93 células.dia^{-1}, devido a que esta cultura alcançou seu valor máximo de replicação no dia 9º, no qual entro em fase estacionaria, em quanto os demais tratamentos continuaram em fase exponencial.

Tabela 11. Velocidades de crescimento (No. Células.dia^{-1}) das amostras do segundo experimento com *Desmodesmus* sp. (V).

Fase de crescimento	***V-80.250***	***V-80.500***	***V-200.250***	***V-200.500***
Exponencial	1,07	1,07	1,93	1,16

Tabela 12. Velocidades de replicação celular (k).dia-1 das amostras do segundo experimento com *Desmodesmus* sp. (V).

Fase de crescimento	***V-80.250***	***V-80.500***	***V-200.250***	***V-200.500***
Exponencial	1,84	1,54	2,79	1,67

A determinaçãodo crescimento por densidade ótica (Figura 12) mostrou um comportamento similar à contagem celular (Figura 11). O tratamento V-200.250 a regressão linear mostrou um R^2= 0,96 em quanto os demais tratamentos mostraram um valor ajuste de R^2= 0,99.

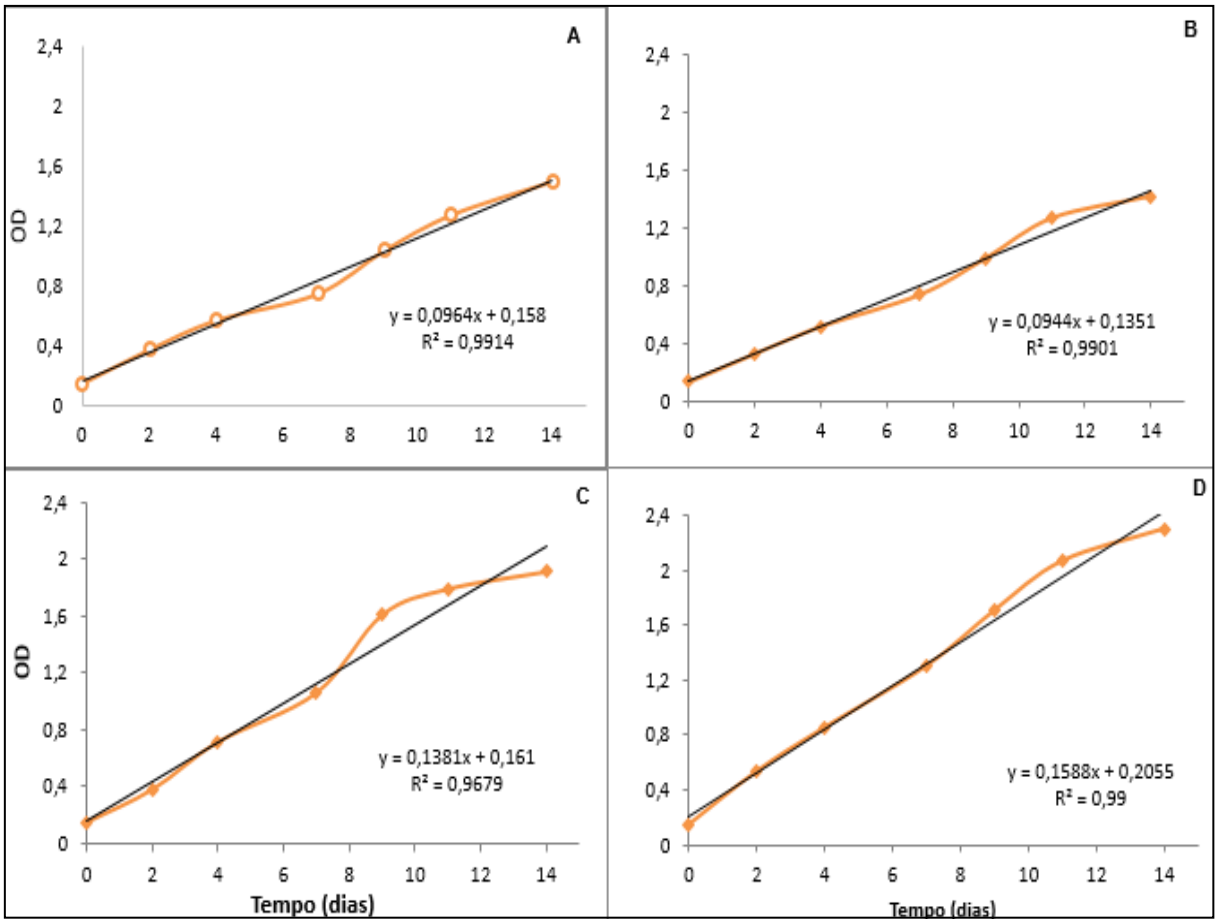


Figura 12 - Curvas de crescimento de *Desmodesmus* sp. V baseado na técnica de turbidez (densidade óptica) durante 14 dias em diferentes condições: A) V-80.250; B) V-80.500; C) V-200.250; D) V-200.500.

A fim de verificar a relação entre os resultados de crescimento celular mediante o método de contagem celular por câmara de Neubauer e a estimativa da densidade óptica, foi realizada uma correlação ente os dados (Figura 13). Os valores de R^2 altos indicam uma boa correlação entre os dois métodos para avaliação do cultivo de *Desmodesmus* sp. Ao mesmo tempo, tem que considerar que na relação demonstrada, as inclinações das retas possuem diferentes graus a depender da intensidade luminosa.

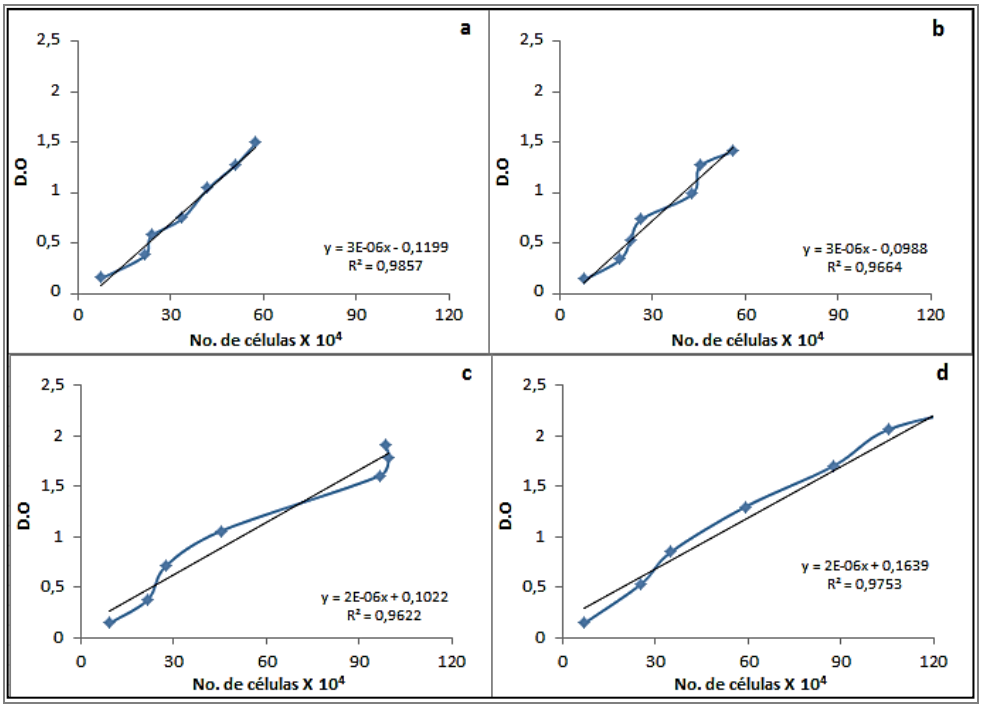


Figura 13 - Correlação entre a contagem e a medida da turbidez nas culturas de *Desmodesmus* sp. durante 14 dias nos tratamentos a) V-80.250, b) V-80.500; c) V-200.250; d) V-200.500.

A Figura 14 mostra a mudança na coloração do cultivo durante os 14 dias de crescimento.

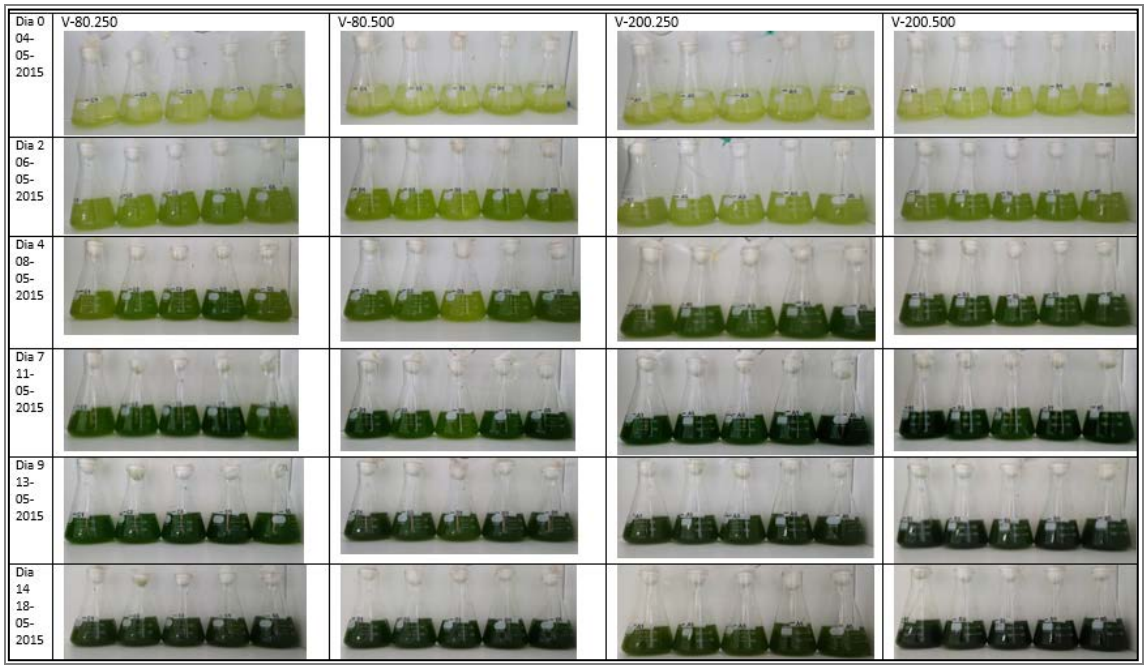


Figura 14 - Aspecto geral da mudança na coloração das culturas V ao longo dos 14 dias de crescimento para todos os tratamentos.

5.4. QUANTIDADE DE CLOROFILAS *a* E *b*

As culturas submetidas à intensidade luminosa de V-80.250 apresentaram em média 16,2 ± 1,4 $mg.L^{-1}$ de clorofila *a* e 20,2 ± 2,4 $mg.L^{-1}$ de clorofila *b* (Figura 15). Essa concentração de pigmentos foi semelhante às culturas com a mesma intensidade luminosa, porém com 500 $mg.L^{-1}$ de NO_3, com valores de 16,9 ± 2,0 $mg.L^{-1}$ para clorofila *a* e 21,7 ± 1,1 $mg.L^{-1}$ para clorofila *b.* Culturas submetidas à intensidade luminosa de 200 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} mostraram maiores concentrações de pigmentos, com 24 ± 2,7 $mg.L^{-1}$ de clorofila *a* e 32 ± 2,9 $mg.L^{-1}$ de clorofila *b* para o tratamento de 250 $mg.L^{-1}$ de NO_3 e 32,4 ± 2,9 $mg.L^{-1}$ de clorofila *a* e 39,7 ± 2,3 $mg.L^{-1}$ de clorofila *b* para o tratamento com 500 $mg.L^{-1}$ de NO_3; Esses cultivos demonstraram valores de clorofila total mais de 60% acima dos valores encontrados nas culturas submetidas a intensidade de luz menores.

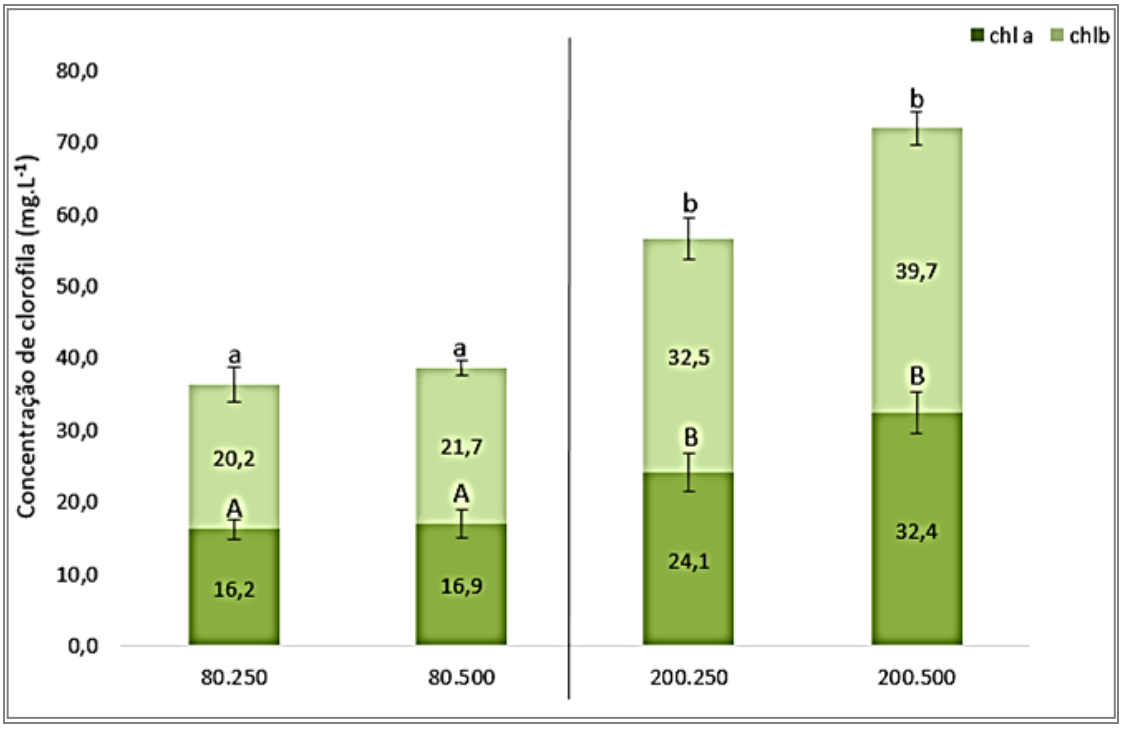


Figura 15 -Concentração de clorofilas *a* e *b* ($mg.L^{-1}$), correspondentes aos diversos tratamentos das culturas V. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Não houve diferenças significativas entre os cultivos submetidos à mesma intensidade luminosa com quantidade diferente de nitrato para clorofilas *a* e *b.* (Figura 15). No entanto, as concentrações de clorofilas *a* e *b* foram

significativamente maiores para os tratamentos sob 200 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, independente da concentração de nutrientes, em comparação com os tratamentos sob menor intensidade luminosa.

5.5. ANÁLISE QUANTITATIVA DE GLICERÍDEOS EM *Desmodesmus* sp.

A biomassa liofilizada das cinco réplicas de cada tratamento foi juntada com a finalidade de realizara quantificação de glicerídeos de cada um dos tratamentos. No Anexo III se mostra os cromatogramas resultantes para a concentração de 40 mg do Mix sintético de glicerídeos, a partir dos quais foram construídas as curvas de calibração.

Estas curvas foram consideradas para identificar e quantificar os grupos de glicerídeos extraídos da biomassa gerada dos experimentos testados com a microalga *Desmodesmus* sp., no entanto cabe destacar que o Mix sintético não proporciona um perfil para este microrganismos pelo que se trata de uma somatória baseada nas concentrações.

Todas as amostras foram injetadas nas mesmas condições com metil-heptadecanoato (MHD)como padrão interno. A Figura 16 mostra o cromatograma do extrato do tratamento L-80.500. Todos os tratamentos mostraram um perfil cromatográfico parecido, variando na área dos picos. Podem-se observar alguns picos antes em tempo de retenção anterior ao padrão interno MHD, porém não foram considerados como monoglicerídeos, por se tratar de cadeias carbônicas menores e foram descartados dos cálculos, sendo denominados como n.i. Todos os tratamentos apresentaram picos menores de TAGs comparados com os MAGs.

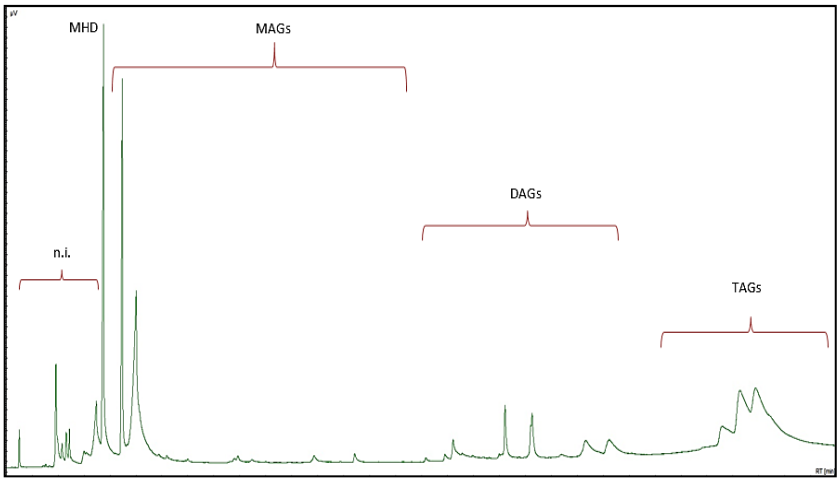
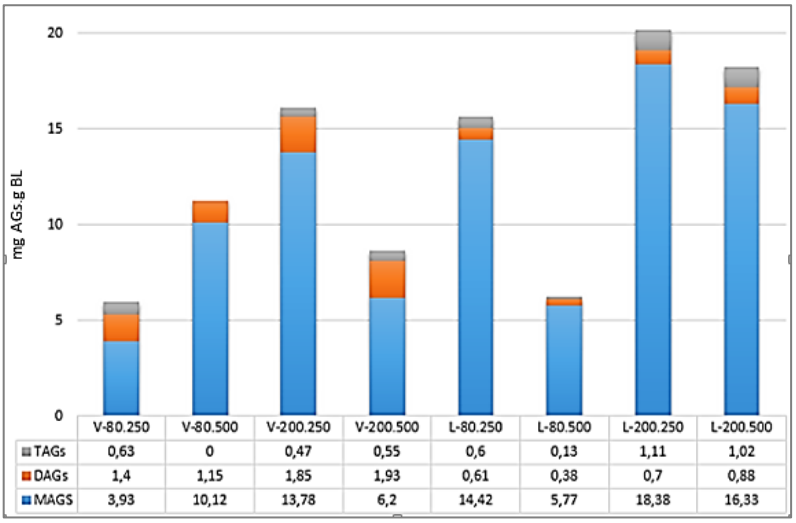


Figura 16- Cromatograma para o perfil de glicerídeos da amostra **L-80.500,** apresentando monoglicerídeos (MAGs), diglicerídeos (DAGs), triglicerídeos (TAGs) e ácidos Não Identificados (n.i.).

A Figura 17 representa a quantidade de cada fração (mono-, di- e tri-) glicérica, calculada a partir da somatória de áreas dos cromatogramas obtidos para os extratos da biomassa de cada tratamento. Pode-se observar que a maior quantidade de glicerídeos foi produzida pela biomassa nos tratamentos com alta intensidade luminosa e reduzida disponibilidade de nitrogênio (200.250) nos cultivos L e V. A maior porcentagem de glicerídeos totais foram de 20,19 mg.g^{-1} BL no cultivo L-200.250.



	V-80.250	V-80.500	V-200.250	V-200.500	L-80.250	L-80.500	L-200.250	L-200.500
TAGs	0,63	0	0,47	0,55	0,6	0,13	1,11	1,02
DAGs	1,4	1,15	1,85	1,93	0,61	0,38	0,7	0,88
MAGS	3,93	10,12	13,78	6,2	14,42	5,77	18,38	16,33

Figura 17- Porcentagem das frações glicéricas (mono-, di- e triglicerídeos) nos diferentes tratamentos de *Desmodesmus* sp.

5.6. POTENCIAL ANTIOXIDANTE

5.6.1. Captura do radical livre ABTS

Para calcular os equivalentes padrão, mediante a análise de ABTS, foram realizadas as curvas dos padrões ácido gálico, trolox, quercetina, BHA, mostradas no Anexo V. A proporção entre os padrões em relação ao ácido gálico (AG) para este ensaio foram, trolox/AG = 0,386 ± 0,006; quercetina/AG = 0,347 ± 0,004 e BHA/AG = 0,594±0,003.

As porcentagens de atividade antioxidante (%AAO) nos diferentes tratamentos são mostradas na Figura 18. As algas cultivadas sob 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das concentrações de nitrato testadas. A tendência de %AAO foi semelhante para amostras cultivadas sob 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, sendo que no tratamento L suprido com 250 mg.mL^{-1} de nitrato, houve redução significativa na %AAO.

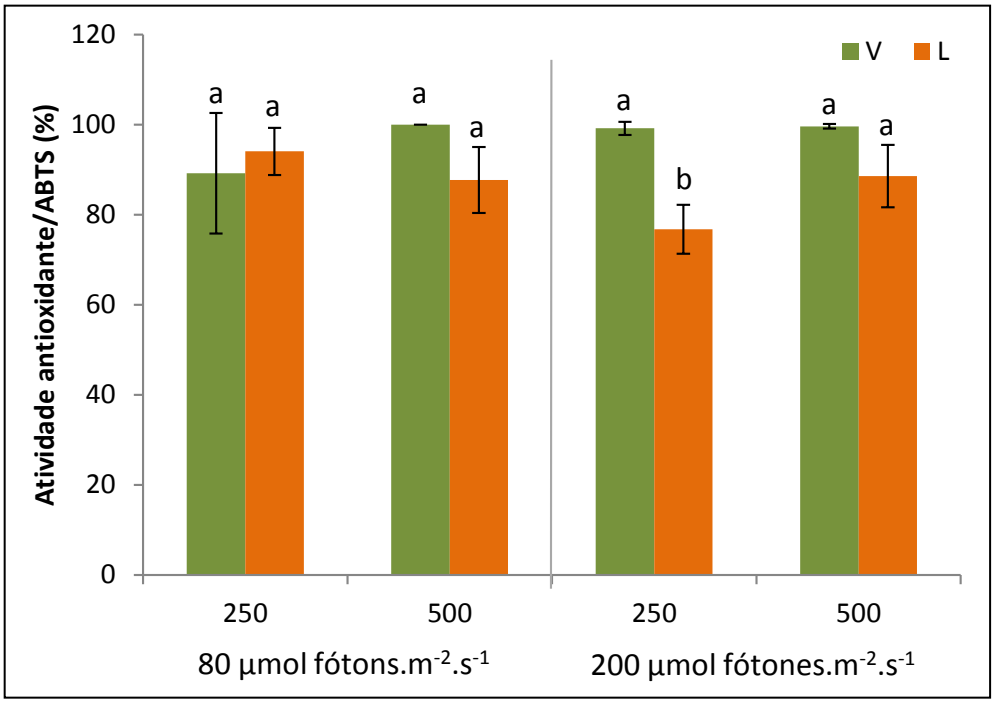


Figura 18-Porcentagem do potencial antioxidante pelo ensaio de ABTS de extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V e L nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

As tendências de equivalentes para cada um dos padrões calculados nos diferentes tratamentos das culturas V e L, apresentadas na Figura 19, mostraram a

mesma tendência, variando apenas na sua magnitude. O único tratamento que apresentou variação significativa foi o tratamento L cultivado em 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 mg.mL^{-1} de nitrato, na qual os diferentes tratamentos estudados não afetaram significativamente no potencial antioxidante mensurado pelo ensaio de ABTS.

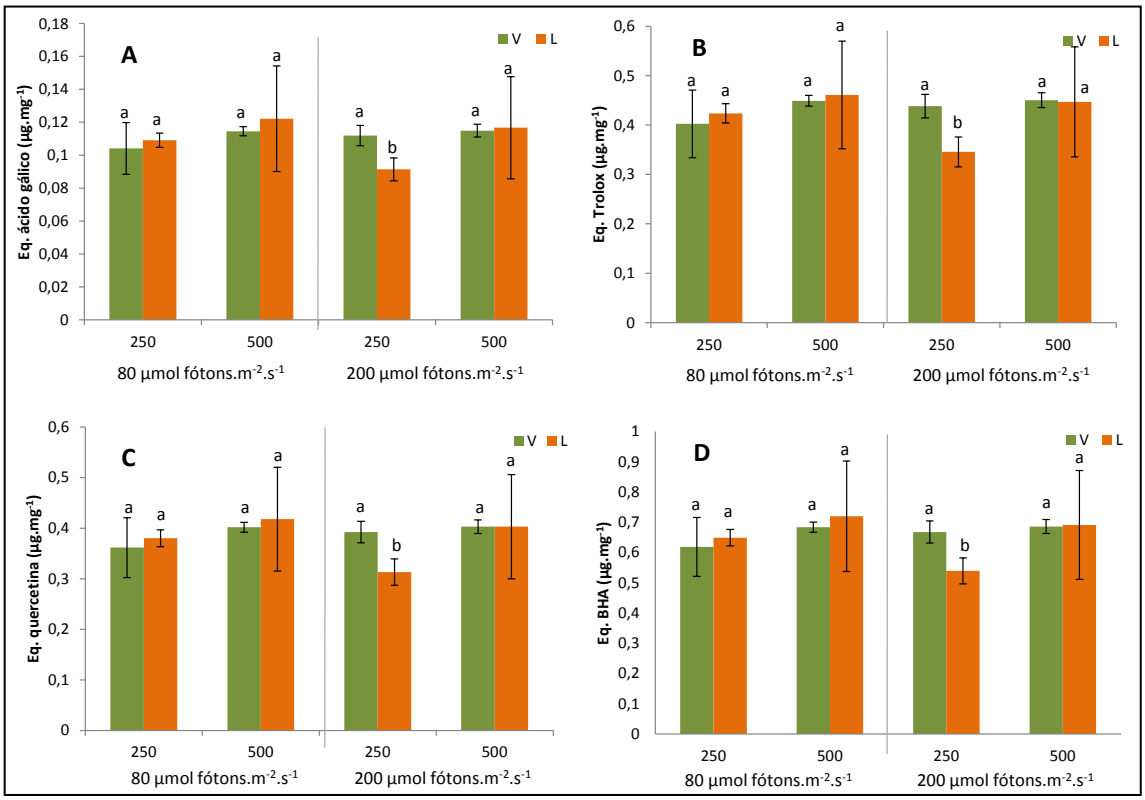


Figura 19- Ação antioxidante em equivalentes padrão de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA pelo método de ABTS para extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos **V** e **L** nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.6.2. Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu

O potencial antioxidante pelo método do Folin-Ciocalteu para os tratamentos dos cultivos V e L mostram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 20), porém sem uma tendência clara entre eles. A única variação que cabe destacar é para cultivos V sob 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, em que houve um aumento significativo da %AAO.

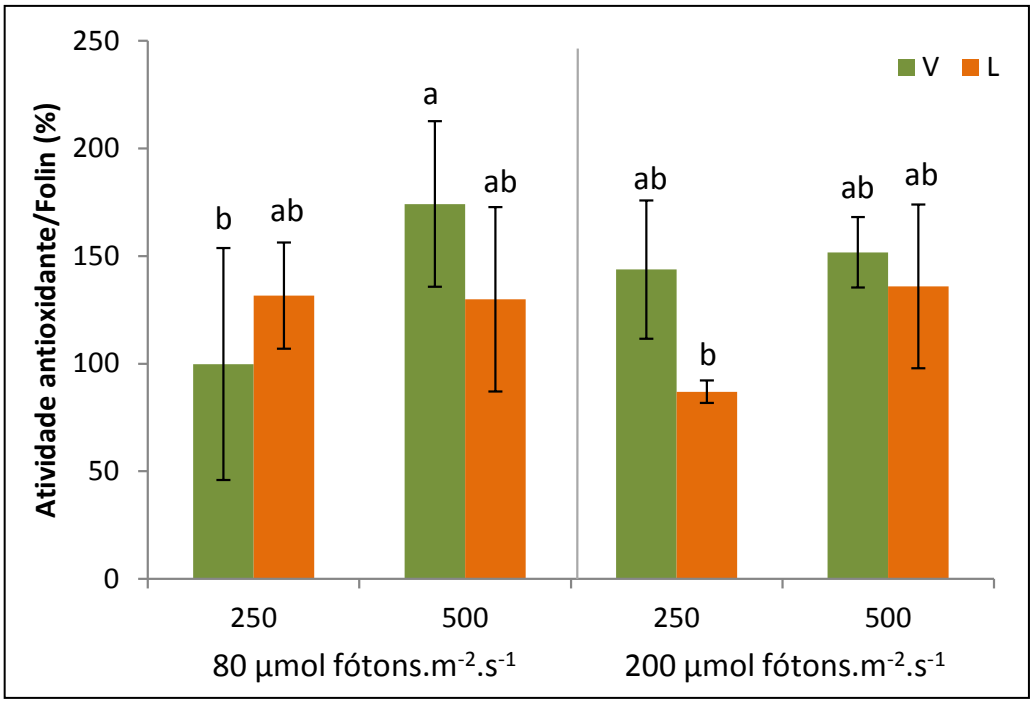


Figura 20- Porcentagem do potencial antioxidante pelo ensaio de Folin-Ciocalteu de extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

As curvas padrões para esse ensaio são mostradas no anexo VI. Para este ensaio, a relação entre o equivalente trolox/AG foi de 0,27 ± 0,4; quercetina/AG = 1,55 ± 0,08 e BHA/AG = 7,02 ± 0,67.

Na Figura 21, se mostram os equivalentes padrão pelo ensaio de Folin-Ciocalteu para cada um dos padrões, mostraram poucas diferenças significativas. Cabe destacar que o tratamento V cultivado em 80 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ apresentou aumento significativo de 250 mg.mL^{-1} de nitrato para 500 mg.mL^{-1}.

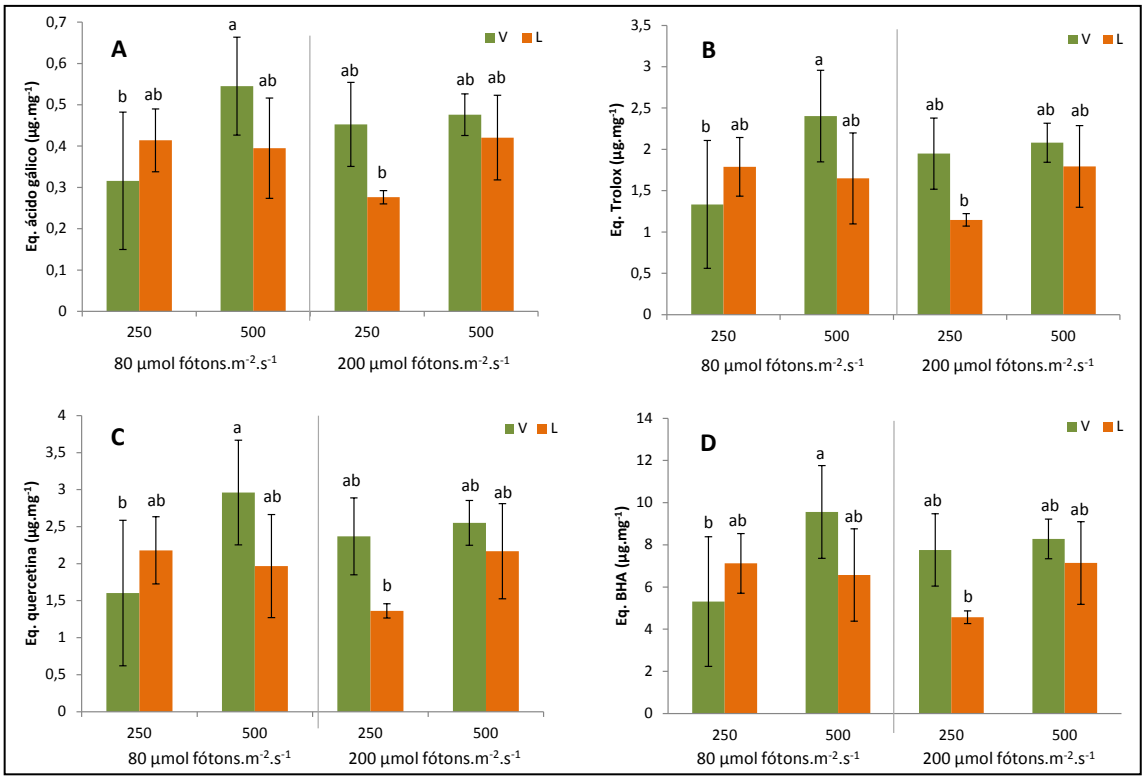


Figura 21- Ação antioxidante em equivalente padrão de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA pelo método de Folin-Ciocalteu para extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.6.3. Ensaio da redução do ferro - FRAP

A porcentagem de atividade antioxidante pelo método FRAP para os diferentes tratamentos dos cultivos V e L não mostraram diferenças significativas (Figura 22). No entanto, cabe notar que existe uma tendência de aumento na %AAO das amostras L em relação a V, diminuição da %AAO em amostras V de 250 mg.mL^{-1} de nitrato para 500 mg.mL^{-1} e aumento da %AAO em amostras L de 250 mg.mL^{-1} de nitrato para 500 mg.mL^{-1}.

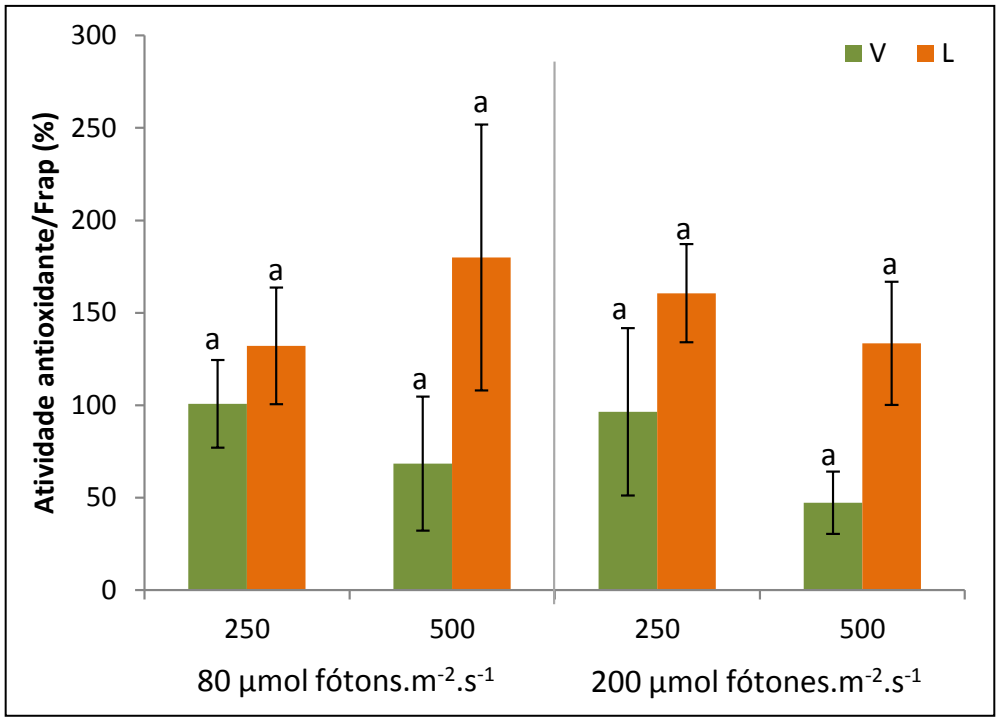


Figura 22-Porcentagem do potencial antioxidante pelo ensaio de Frap de extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

As curvas padrões para esse ensaio são mostradas no anexo VII. Para este ensaio, a relação entre os diferentes padrões baseado no ácido gálico foram trolox/AG = 2,56 ± 0,24; quercetina/AG = 1,04 ± 0,07 e BHA/AG = 1,74 ± 0,35.

Os resultados de equivalentes padrão pelo método de FRAP, para os diferentes tratamentos, não mostraram diferenças significativas (Figura 23). Da mesma forma, é possível notar uma tendência de aumento dos equivalentes padrão das amostras L em relação a V, diminuição dos equivalentes padrão em amostras V de 250 mg.mL^{-1} de nitrato para 500 mg.mL^{-1} e aumento dos equivalentes padrão em amostras L de 250 mg.mL^{-1} de nitrato para 500 mg.mL^{-1}.

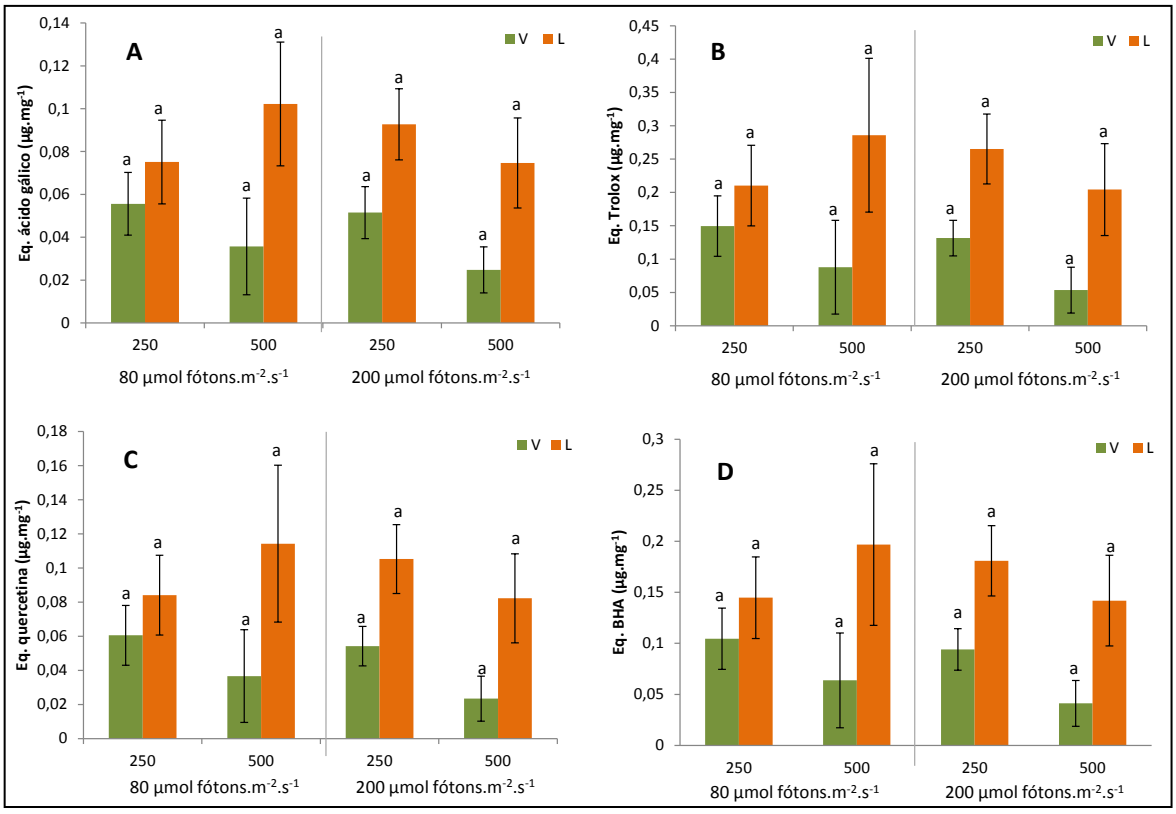


Figura 23- Ação antioxidante em equivalente padrão de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA pelo método de FRAP para extratos de *Desmodesmus* sp. dos cultivos V (verde) e L (laranja) nos tratamentos de 80 ou 200 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ e 250 ou 500 mg.mL^{-1} de nitrato. As barras representam valores de média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.7. ANÁLISE DO PERFIL AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs)

A análise do perfil de MAAs foi realizado inicialmente com a amostra do tratamento V-80.500. O cromatograma mostrou um pico no tempo 7,9 min, com magnitude de mAU muito reduzida, cerca de 18. O espectro UV desse pico não correspondeu a nenhum espectro de MAAs. Vários outros testes foram feitos com amostras de diferentes tratamentos dos cultivos V e L, porém, não foi possível detectar MAAs. As amostras foram corridas em metodologias cromatográficas de fase normal e fase reversa, no entanto, nenhuma MAAs foi detectada. São recomendados maiores estudos em *Desmodesmus* destas substâncias.

6. DISCUSSÃO

As microalgas são consideradas organismos ricos em importantes metabólitos para diversas aplicações (GRIMA, 2003; SILVA *et al.,* 2003; BECKER, 2004; GOUVEIA & OLIVEIRA, 2009; CARRETO, 2011; ARIAS *et al.,* 2013; KENT *et al*., 2015). As pesquisas feitas com espécies de microalgas verdes continuam em aumento, focando-se principalmente na compressão do metabolismo dessas espécies (DERNER *et al.,* 2006). Um dos maiores desafios que apresentam as microalgas é a produção de biomassa em grandes volumes. Dessa forma, conhecer as repostas metabólicas às diferentes condições às quais se submetem as culturas, resulta de interesse tantopara a produção de biomassa como para o direcionamento da síntese de metabólitos específicos.

6.1. RE-ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO DA CULTURA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA*Desmodesmus* sp.

Com a finalidade de conhecer as propriedades de um organismo, o isolamento das culturas garante a produção de biomassa que pode ser explorada para a produção de metabólitos (CONTI, 2012). O isolamento da *Desmodesmus* sp. obteve-se sucesso. Recomenda-se que para um sistema de produção de biomassa, a cultura deve estar o mais livre possível de contaminantes, pois estes podem levar à competição por nutrientes e como conseguinte um decréscimo na produtividade da microalga (SIGEE, 2005).

O meio BBM é extensamente utilizado por diversos autores (BRENNAM, 2010; ILAVARASI *et al.*, 2011; HANIFA *et al.*, 2015), pois propicia as condições necessárias para sobrevivência, crescimento, e estocagem de *Desmodesmus* sp. e de outras espécies de microalgas, possibilitando uma rápida produção de biomassa aumentando apenas um volume determinado de inóculo para cada repicagem. WOJCIECHOWSKI (2015) recomenda que cada inóculo seja aproximadamente de 10% do volume novo e ocupe 1/3 do volume total do recipiente, no em tanto no caso da primeira batelada o inoculo foi feito seguindo essa recomendação, levando à cultivos muito concentrados, o que pode ter influenciado o efeito das diferentes intensidades luminosas aplicadas. Por isso na segunda batelada foi considerada uma primeira contagem para determinar uma concentração menor de células iniciais.

6.3. TAXA DE CRESCIMENTO

Para as amostras da primeira batelada de experimentos, *Desmodesmus* sp. não mostrou diferença nos tratamentos com 80 e 200 µmol fotons.m^2.s^{-1}, devido a uma rápida saturação do meio com uma quantidade excessiva de células, fato que resulta numa má distribuição da luz dentro do cultivo (BENAVENTE *et al.,* 2012) ou no efeito de sombreamento (MOLINA-GRIMA, 1993, CONTRERAS-FLORES *et al.,* 2003; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011; PARK *et al.* 2011a*).*

SOLOVCHENKO (2013) observou, em cultivos de *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1, que quando iniciados os cultivos com concentrações iniciais maiores que 25 mg Chl.L^{-1} responderam lentamente comparando com aquelas culturas inoculadas com uma concentração menor (5 mg Chl.L^{-1}), mostrando um crescimento superior na mesma intensidade de luz (480 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1}).

Para a segunda batelada de experimentos deste trabalho foi considerada uma concentração menor (aprox. $8X10^4$ cel.mL^{-1}), com a finalidade de observar as mudanças em quanto a diferença na intensidade luminosa.

Os resultados da primeira batelada de experimentos mostram que cultivos com menor concentração de nitrato (250 mg.L^{-1}) tiveram uma fase estacionária estendida, no entanto, as culturas alimentadas com maior concentração de nitratos alcançaram maior número de células nessa fase. Dessa forma, é possível afirmar que, nas condições estudadas, o crescimento de *Desmodesmus* sp. responde positivamente ao aumento de nitrato para a produção de número de células.

Um comportamento similar foi observado por PANCHA *et al.* (2014) usaram diferentes concentrações de nitrato (de 123,5 mg.L^{-1} para 5 mg.L^{-1}), observando que a redução na disponibilidade deste elemento desacelera a atividade metabólica e a divisão celular em *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, diminuindo a concentração de biomassa até 44,77% de peso seco.

Visto que microalgas são organismos autotróficos que dependem da luz, esta é um fator importante para a produção de biomassa. No entanto, o excesso de luz (intensidades maiores a 400 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1}) pode provocar danos nas células mediante processos de fotoinibição, fotooxidação e fotoinativação, modificando o seu metabolismo, induzindo à produção de moléculas fotoprotetoras e mudanças na

coloração devido a fotodanificação dos pigmentos fotossintetizantes (RICHMOND, 2004; PARK *et al.*, 2011a;). As culturas L crescidas durante 29 dias apresentaram mudança de cor, de esverdeado a alaranjado, sob condição de 200 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1}. Em este sentido, GRABSKI*et al.* (2015) observaram que o aumento da intensidade da luz induziu a produção de pigmento vermelho em células de *Desmodesmus subspicatus*, mesmo fenômeno observado em *Desmodesmus* sp. deste estudo.

Ao igual queTAKAICHI*et al.*(2011) demonstraram que várias espécies de microalgas sintetizam carotenoides como mecanismo de fotoproteção. Para a espécie *Scenedesmus obliqus* os carotenoides encontrados foram ² -caroteno, neoxantina, loroxantina, violaxantina e luteína (CHU *et al.,* 2011), podem ser considerados estudos mais aprofundados com a *Desmodesmus* sp., com a finalidade de identificar esses pigmentos.

Tendo em consideração as curvas da segunda batelada, poderia se explicar que o tratamento V.80-500, com luminosidade menor e maior concentração de nitrato, teve reprodução celular mais rápida, provavelmente favorecida pela maior disponibilidade de nitrato. No entanto, uma exposição à energia luminosa menor poderia não ter induzido altos níveis de fotossíntese, o que levaria a uma taxa de crescimento menor, comparada com as culturas submetidas a 200 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1}), apresentando uma biomassa final de 5,62 x10^5 cél.mL^{-1}, porém a cultura não atingiu a fase estacionaria. Por outro lado, o tratamento V-200.250, com maior disponibilidade de luz, apresentou crescimento mais acelerado, quando comparado com os tratamentos com menor incidência de luz, apresentando uma biomassa de 9,68 x10^5 cél.mL^{-1}, mas esta cultura iniciou a fase estacionaria no 9º dia após a inoculação. Esse resultado pode ser atribuído a uma inibição do crescimento por limitação de nutrientes, visto que ao aumentar a incidência luminosa é necessário disponibilizar uma quantidade de nutrientes condizente à taxa metabólica do cultivo (SCHMITZ, 2012).

A cultura provinda com maior quantidade de luz e nutrientes (V-200.500) cresceu 240% a mais, com 1,36 x10^6 cél.mL^{-1}, que o tratamento V-80.250 com 5,75 X 10^5 cél.mL^{-1}. Os resultados com *Desmodesmus* sp. são similares aos observados em várias espécies de microalgas, como *Chlorella* sp. (ILLMAN *et al.,* 2000) e

Botryococcus braunii (DAYANANDA *et al.,* 2007), em relação à disponibilidade de nutrientes. Para *Desmodesmus subspicatus*, a escassez de nitrogênio foi considerada um fator importante tanto para a diminuição do crescimento de biomassa, como para induzir a degradação de clorofila (GRABSKI *et al.,* 2015).

As contagens de células utilizando-se câmaras de contagem representam um método lento e trabalhoso. Para verificação da possibilidade de uso de leituras de absorbância (densidade óptica) em substituição às contagens, trabalhou-se em teste específico para calibração das curvas de absorbância frente às contagens de células, tendo uma relação positiva entre as duas técnicas.

Diversos estudos teóricos y experimentais tem mostrado, que em soluçõesdiluídas, independentemente do tipo de microalga ou o tamanho destas, poderia relacionar-sediretamente a sua biomassa em peso seco ou peso úmido. Para estimar o número de células totais ou número de células viáveis, deve realizar-se a curva de calibração para cada espécie, considerando as condições as quais foi submetida (CAMACHO,2010). No caso da *Desmodesmus* submetida nas condições de 80 e 200µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, a técnica de densidade ótica poderia ser usada em futuros trabalhos nas mesmas condições.

6.4. QUANTIDADE DE CLOROFILAS *a* E *b*

Os resultados da *Desmodesmus* sp. mostraram uma correlação direta entre o conteúdo de clorofilas e o número de células, as quais, responderam ao tratamento com maior intensidade luminosa. Estudos feitos com outras espécies de *Desmodesmus* apresentaram uma resposta similar, na qual a produção de clorofilas acompanha diretamente o crescimento celular quando há indução com maior intensidade luminosa nas culturas (ILAVRSI *et al.,* 2011; SOLOVCHENKO *et al.,* 2012; NUR *et al.,* 2014; GRABSKI *et al.,* 2015). Podendo observar que as culturas submetidas a 200 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1}apresentaram 65% mais clorofila total, assumindo que a exposição a altas intensidades de luz pode estimular a produção de pigmentos e outras moléculas capazes de absorver a radiação (CARRETO *et al.,*1990).

6.5. PERFIL GLICERÍDEOS TOTAIS

A porcentagem maior de glicerídeos de *Desmodesmus* sp. para todos os tratamentos corresponderam a MAGs. A maioria dos lipídios a partir de microalgas

são lipídios de membrana, com uma contribuição menor de TAGs, os quis correspondem a ésteres e hidrocarbonetos (RICHMOND, 2004; HU *et al.*, 2008). Para os tratamentos L que mostraram maior quantidade de MAGs foram L-200.250 com 18,38% e L-200.500 com 16,33%, pelo que poderíamos considerar que a cultura foi estimulada para a produção de estes metabólitos em resposta ao estresse pela intensidade de luz.

Adicionalmente, o tratamento L-200.250 apresentou maior teor de TAGs (1,11%), fato que poderia se atribuir ao estresse por falta de nitrato (MATTHEW *et al.,* 2009). Resultados similares foram observados em *Chlamydomonas reinhardtii*,quando a cultura foi submetida a estresse por nutrientes, entrando em fase estacionária após 5 dias, mostrando incremento no conteúdo de TAGs em dita fase(MATTHEW *et al.,* 2009).

Foi observado que *Desmodesmus* sp. sob uma maior intensidade luminosa (200 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}), se produz uma quantidade maior de glicerídeos após 29 dias de cultivo. Porém é necessário realizar outros estudos de estresse para diminuir o período de crescimento, aumentando ao mesmo tempo a quantidade de glicerídeos. VELICHKOVA (2013) mostrou que *Scenedesmus dimorphus* cultivada durante 16 dias teve sua velocidade de crescimento aumentada em 76% quando suprida com maior concentração de nitrogênio. No entanto, essas culturas mostraram menor porcentagem de lipídios totais (>15%).

XIA *et al.* (2014) avaliaram a adição de diferentes concentrações de sais em culturas de *Desmodesmus abundans*, obtendo maior produção de lipídios (67,08 mg.L^{-1}.d^{-1}) adicionando NaCl ao meio de cultivo, porémainda existem outros fatores que poderiam ser testados com pH, temperatura e fontes de carbono, com o objetivo de aumentar a produtividade da *Desmodesmus* sp.

6.6. POTENCIAL ANTIOXIDANTE

As microalgas estão constantemente expostas a estresse abiótico, promovido por um ambiente altamente oxigênico e uma elevada intensidade luminosa. Essas condições estimulam a transformação de metabólitos primários em moléculas que conferem resistência à alga frente a tal estresse.

Para o método de Folin–Ciocalteu os valores maior e menor em *Desmodesmus* sp. foram de 0,54 $mg.g^{-1}$ e 0,27 $mg.g^{-1}$ EAG (equivalentes em ácido gálico), correspondentes aos tratamentos V-80.500 e L-200.250, respectivamente, sem apresentar diferencias significativas entre os tratamentos. Estudos feitos com *Desmodesmus* têm mostrado valores maiores de atividade antioxidante. SAFAFA *et al.* (2015) destacaram *Desmodesmus* como a melhor dentre outras diversas espécies de microalgas cultivadas em água residual, com valor de 7,72 $mg.g^{-1}$ EAG, pelo que os resultados obtidos para este trabalho, mostram baixa atividade antioxidante. MACHU *et al.* (2015) compararam metodologias de extração onde a cianobactéria *Spirulina platensis* apresentou valores de 23 $mg.g^{-1}$ EAG quando extraída com MeOH 80% e 70ºC, enquanto que a mesma espécie mostrou valores de 24,4 $mg.g^{-1}$ EAG quando extraída com MeOH e 23ºC. Esses resultados mostram que a metodologia de extração poderia ser crucial para obter um melhor resultado de ação antioxidante.

Para o método de ABTS, os valores apresentados para *Desmodesmus* sp. foram 0,54 $mg.g^{-1}$ de equivalente trolox e 0,34 $mg.g^{-1}$ de equivalente trolox (2,16 - 1,36 µmol $Trolox.g^{-1}$ biomassa), correspondentes aos tratamentos V-200.500 e L-200.250, respectivamente, os que não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. LI *et al.* (2006) mostraram que diversas espécies de *Chlorella* possuem atividade antioxidante equivalente entre 5,67 – 15,50 µmol Trolox/g biomassa.

Em quanto ao método de Frap, os valores apresentados em *Desmodesmus* sp. foram 0,197 $mg.g^{-1}$ BHA e 0,064 $mg.g^{-1}$ BHA, correspondentes aos tratamentos L-80.500 V-80.500, respectivamente. Para *Desmococcus,* UMA *et al.* (2011) apresentaram valores de 0,033 $mg.g^{-1}$ BHT. Por outro lado, SAFAFA *et al.* (2015) observaram que uma concentração de 1 $mg.mL^{-1}$ de extrato metanoico de *Desmodesmus* apresentou maior capacidade redutora de ferro (0,075 $mg.g^{-1}$ EAA) quando comparada com outras espécies.

A diversidade de estudos de atividade antioxidante é amplamente estudada em frutos e alimentos vegetais. Considerando que *Desmodesmus* sp. representa uma potencial fonte rica em antioxidantes naturais, tais como carotenoides (e.g.

luteína), tocoferóis e compostos fenólicos (SAFAFA *et al.,* 2015), estes estudos poderiam ser amplamente explorados e aprofundados.

6.7. AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs)

Para este trabalho, a análise da síntese de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) não mostrou um resultado positivo. Existem diversos fatores que podem ter ocasionado o dito resultado. Um deles poderia dever-se à extração, pois TARTAROTTI & SOMMARUGA (2002) mostraram rendimentos baixos em amostras secas quando usaram metanol puro como solvente, sendo melhor uma extração com uma mistura de MeOH:H_2O (1:3, v/v). Por outro lado, MARQUEZ (2015) obteve menor quantidade de MAAs quando usou biomassa liofilizada de *P. brasiliense* em comparação com a biomassa fresca. Por último, existem trabalhos que mostram a presença de MAAs em microalgas verdes como *Dunalliela* (HANNACH & SIGLEO, 1998), *Chlorella (*SONNTAG *et al.,* 2004) e *Scenedesmus* (FUSHENG XIONG *et al.,*1997) após a exposição das espécies a estresse com radiação UV. Assim, recomenda-se maiores estudos, tanto de métodos de extração e sob condições de estresse, para avaliar a presença destes importantes metabólitos em *Desmodesmus*.

Finalmente, os resultados dos diferentes parâmetros analisados em *Desmodesmus* sp. neste estudo mostram que a microalga responde de forma diferenciada aos diversos tratamentos testados, na qual a junção de intensidade luminosa e disponibilidade de nutrientes promove respostas diferentes que podem ser relacionadas com a maior demanda metabólica regulada pela luz e limitação de nutrientes. No caso do potencial antioxidante, na qual as diferentes condições de luz e nutrientes não evidenciaram diferenças significativas, podem ser devidas às amostras terem sido coletadas no final da fase logarítmica, não permitindo perceber a variação deste parâmetro. Sendo assim, sugere-se que futuros estudos sejam realizados a fim de melhor compreender como o potencial antioxidante muda nas diferentes condições de estresse.

Segundo SOLOVCHENKO (2013), os mecanismos adaptativos das microalgas são ativados orquestradamente, a fim de conciliar o estímulo ou

defesa induzido pela elevação da intensidade luminosa, aliado à disponibilidade de nutrientes, no aumento na velocidade de replicação, no teor de clorofilas e de ácidos graxos e mecanismos antioxidantes.

7. CONCLUSÕES

O gênero *Desmodesmus* (Chlorophyta) possui potencial para a produção de biomassa devido a sua ampla distribuição e aceitação aos câmbios abióticos. As adaptações que apresenta esta microalga conferem sua importância na produção de metabolitos de interesse.

Baseando-se nos resultados apresentados neste trabalho se produz uma maior quantidade de biomassa quando se aumenta a intensidade luminosa, no entanto deve-se aumentar a concentração de nutrientes. Neste caso, a cultura V submetida a 200 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 500 mg.L^{-1} de $NaNO_3$ apresentou 60% mais biomassa quando comparado com os outros tratamentos.

A quantidade de clorofila total foi diretamente proporcional ao crescimento da biomassa. Pode-se imaginar um cultivo industrial para a geração da biomassa fresca em condições enriquecedoras de luz e nitrogênio, no entanto a quantidade de metabolitos secundários de interesse comercial é gerada a partir da biomassa em estresse por nutrientes. Tal foi o caso do potencial antioxidante, na qual sob as diferentes condições de luz e nutrientes não gerou diferenças significativas, mas existiu um aumento na fase estacionaria da microalga, o que sugere que as culturas podem apresentar mudanças no metabolismo em função das condições ambientais e o agotamento de nutrientes.

Não foram encontradas as MAAs, provavelmente porque a intensidade de luz PAR não foi suficiente, ou porque é preciso submeter a cultura a radiação UV. Para as culturas que foram cultivadas com 200 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} e 250 mg.L^{-1} de $NaNO_3$, a quantidade de ácidos graxos foi maior.

A confirmação de atividade antioxidante poderia elevar o valor comercial da *Desmodesmus* como alimento humano ou aditivo e expandir seu mercado consumidor. No Brasil, particularmente, as algas e as microalgas são pouco exploradas comercialmente, sendo quase que restrita a alguns gêneros de algas vermelhas. Este trabalho contribui na pesquisa de microalgas verdes como opção nutricional que pode ser escalonada a níveis de produção industrial. No em tanto, devem ser considerados, estudos de riscos e inocuidade alimentaria ou epidemiológica.

8. REFERÊNCIAS

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, *ET AL*. Essential Cell Biology: an introduction to the molecular biology of the cell. New York & London: Garland Publishing Inc., 1998.

ALGAEBASE. National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). Guiry, Michael D. (2015). Geminella Turpin, 1828. In: Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2015). Accessed through: World Register of Marine Specie. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=248122> Acesso em: 19 jan 2016.

ALGAE BIOMASS ORGANIZATION. 2015 Algae Industry Survey Executive Summary. Disponível em:<http://algaebiomass.org/resource-center/references/industry-statistics/> Acesso em: 26 jan. 2016.

AMAL, M; NAWAL, M; TARIK, A; HICHAM, EL A; REDOUANE, B; SAAID, A; YOUSSEF, B; IMANE, W; Production of Antioxidants by Anabaena PCC 7119 and Evaluation of Their Protecting Activity Against Oxidation of Soybean Oil. Food Biotechnology v.20, n1. 2014.

ARIAS P, M. T.; MARTÍNEZ R, A. DE J.; CAÑIZARES V, R. O. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biológica Colombiana, Bogotá, v. 18, n.1, p.43-68, 2013.

BANDARRA, N.M.; PEREIRA, P.A.; BATISTA, I.; VILELA, M.H. Fatty acids, sterols and ±-tocopherol in isochrysis galbana. J. Food Lipids v.10, p.25–34, 2003.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: A.RICHMOND (Ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, p. 312-351. 2004.

BELOTTI G., BRAVI M., CAPRARIIS B., FILIPPIS P. & SCARSELLA M., "Effect of Nitrogen and Phosphorus Starvations onChlorella vulgaris Lipids Productivity and Quality under Different Trophic Regimens for Biodiesel Production,"American Journal of Plant Sciences, v. 4, v. 12b, p. 44-51. 2013. doi: 10.4236/ajps.2013.412A2006.

BEN-AMOTZ, A. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: Dunaliella. em: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science. p.273–280. 2004.

BENAVENTE V. J. R., MONTAÑEZ, J. C., AGUILAR C. N. , MÉNDEZ Z. A., VALDIVIA B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Revist de divulgación científica. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, México, v. 4, n. 7, 2012.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de Chlorella vulgaris cultivada em solução hidropônica residual. Ciência Rural, Santa Maria, v. 38, n. 1, p.54-58, jan. 2008.

BORGES, L. L. CARVALHO, T. L; SOUZA, E. G & BARBOSA E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. Enciclopedia Biosfera, Goiânia, v. 7, n. 12, p.1-20, 2011.

CABRAL, I. S. R. *SHIRAHIGUE, L. D; DE ARRUDA, L. F; CARPES S. T; OETTERER,M;* Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Parana, v.29, n.2, p.181-192, 2012. http://dx.doi.org/10.5380/cep.v29i2.25481.

CARDOZO, K. H. M; GUARATINIA, T; BARROS, M. P; FALCÃOA, V. R; TONONA, A. P; LOPES, N. P; CAMPOSA, S; TORRES, M. A; SOUZA, A. O; COLEPICOLO, P; PINTOD, E. Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Elsevier BV, v.146, n.1-2, p.60-78, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O; Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. Marine Drugs, v.9, n.12, p.387-446, 2011. http://dx.doi.org/10.3390/md9030387.

CARRETO, J.I. Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate Alexandrium excavatum: UV-photoprotective compounds. J Plankton Res, Oxford University Press (OUP). v.12, n.5, p.909-921, 1990. http://dx.doi.org/10.1093/plankt/12.5.909.

CARVALHO, A.P.; MALCATA, F.X. Optimization of É-3 fatty acid production by microalgae: Crossover effects of CO_2 and light intensity under batch and continuous cultivation modes. Mar. Biotech., v.7, p.381–388. 2005.

CHEN, Y; QINGYU, W. Production of Biodiesel from Algal Biomass: Current Perspectives and Future. In: PANDEY, Ashok *et al* (Ed.). Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. Oxford: Elsevier, p. 399-413. 2011.

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*. Bioresour. Technol v.102, p.1649–1655. 2011.

CHISTI, Y; Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, Elsevier BV v. 25, n. 3, p.294-306, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

CONTI, R.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiontes como fontes de produtos naturais bioativos. Cienc. Cult., São Paulo, v. 64, n. 3, 2012.

CONTRERAS-FLORES C, J PEÑA-CASTRO, L FLORES-COTERA & R CAÑIZARES-VILLANUEVA. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia v.28, n.8, 2003, p. 450-456.

DARONCHO, M. Quantificação da atividade antioxidante através de análises pelos métodos DPPH e ABTS. In: VI SEMINÁRIO DE NUTRIÇÃO DA UNIFRA, Santa Maria. Anais... . Santa Maria: Unifra, v.1, p. 2005 - 2007. 2012.

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. Bioresour. Technol v.101, 4499–4507. 2010.

DERNER, R. B; VILLELA, M; CARVALHO, S.M. & FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. Cienc. Rural, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DOS SANTOS, M.D; GUARATINI, T; LOPES, J.L.C. & COLEPICOLO P. Plant cell and microalgae culture. Modern Biotechnology in Medicinal Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005.

DUARTE, D. R.S. Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

ENALGAE 2013. In context: An industry overview. Disponível em: <http://www.enalgae.eu/getfile.php?type=site_documents&id=EnAlgae Report Card finished_sml2.pdf>. Acesso: 26 janeiro, 2016.

FERREIRA, V.S.; PINTO, R.F; SANT'ANNA, C. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. J Appl Microbiol, Wiley-Blackwell. v.120, n.3, p.661-670, 2016. http://dx.doi.org/10.1111/jam.13007.

FORJÁN, E.; GARBAYO, I.; HENRIQUES, M.; ROCHA, J.; VEGA, J.; VÍLCHEZ, C. UV-A mediated modulation of photosynthetic efficiency, xanthophyll cycle and fatty acid production of Nannochloropsis. Mar. Biotechnol v.13, p.366–375. 2011,

FREITAS, L; BUENO, T; PEREZ, V.H. &CASTRO H.F. Monoglicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações. Quím. Nova, São Paulo, v.31, n.6, p. 1514-1521, 2008.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. Science, American Association for the Advancement of Science (AAAS). v.294, n.5548, p.1871-1875, 2001. http://dx.doi.org/10.1126/science.294.5548.1871.

GODINHO, L. R. Família Scenedesmaceae no Estado de São Paulo: Levantamento florístico. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo. 2009.

GRABSKI, K; BARANOWSKI, N; SKÓRKO-GLONEK, J; TUKAJET, Z. Chlorophyll catabolites in conditioned media of green microalga *Desmodesmus subspicatus*. J Appl Phycol, Springer Science + Business Media. v.28, n.2, p.889-896, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0618-1.

GREBOW, J. Ingredient Trends to Watch for Food, Drinks, and Dietary Supplements: Algae.| Food & Beverage, Delivery Systems, Omega-3, Trends & Business. 2016. Disponível em: <http://www.nutritionaloutlook.com/food-beverage/2016-ingredient-

trends-watch-food-drinks-and-dietary-supplements
algae?platform=hootsuite#sthash.lFBB0UQZ.dpuf>

GRIMA, E. M; BELARBI, E.H; FERNANDEZ A. F. G; ROBLES M. A. & CHISTI Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances, Elsevier BV v.20, n.7-8, p.491-515, 2003. http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00050-2.

GUEDES, A. C; GIÃO, M. S; SEABRA R; SILVA, F. A. C; TAMAGNINI, P; MORADAS-FERREIRA, P. AND F. MALCATA, X. Evaluation of the Antioxidant Activity of Cell Extracts from Microalgae. Mar. Drugs v.11, 1256-1270. 2013. doi:10.3390/md11041256

HANIFA TAHER, SULAIMAN AL-ZUHAIR, ALI AL-MARZOUQI, YOUSEF HAIK, & MOHAMMED FARID. Growth of microalgae using CO2 enriched air for biodiesel production in supercritical CO_2. Renewable Energy. 2015. doi:10.1016/j.renene.2014.08.013.

HANNACH, G; SIGLEO, Ac. Photoinduction of UV-absorbing compounds in six species of marine phytoplankton. Marine Ecology Progress Series, Inter-Research Science Center v. 174, p.207-222, 1998. http://dx.doi.org/10.3354/meps174207.

HARWOOD, J. L. Membrane lipids in algae. In: SIEGENTHALER, MURATA P. A; N. Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Amsterdam: Springer Netherlands, p. 53-64. 1998.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). Archiv für Hydrobiologie, Suppl v.131 n.96, p. 1-18, 2000.

HO, S-H. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga Desmodesmus sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. Bioresource Technology, Elsevier BV v.156, p.108-116, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.017.

HSIEH, C; WU, W. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation.Bioresource Technology, [s.l.], v. 100, n. 17, p.3921-3926, set. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.019.

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 Elsevier BV, v. 27, n. 8, p.631-635, 2000. http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00266-0.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen, Jena, v. 167, p.191-194, 1975.

JOHNSON, Hilary L. et al. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. Environmental Toxicology, [s.l.], v. 22, n. 3, p.234-244, 2007. Wiley-Blackwell. http://dx.doi.org/10.1002/tox.20265.

KAEWTHONG W.; SIRISANSANEEYAKUL S.; PRASERTSAN P. Process Biochem n.40, p.1525, 2005.

KENT, Megan et al. Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. Plos One, Public Library of Science (PLoS). v. 10, n. 2, p.1-14, 2015. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118985.

KOEN, G; WILLEM, V. C; WILCHESC I; LEÓN-TAMARIZC, F; COOMANA L. DE, MUYLAERTB, K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. Algal Research v.7, p. 51–57, 2015.

LI, Y. et al. Biofuels from Microalgae. Biotechnol. Prog, Wiley-Blackwell. p.815-820, 2008. http://dx.doi.org/10.1021/bp070371k.

LIANG, Y.; BEARDALL, J.; HERAUD, P. Effects of nitrogen source and uv radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of Phaeodactylum tricornutum and Chaetoceros muelleri (bacillariophyceae). J. Photochem. Photobiol. B-Biol, v.82, p.161–172, 2006.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. São Carlos: Rima, p.588, 2006.

LYNN, S.G.; KILHAM, S.S.; KREEGER, D.A.; INTERLANDI, S.J. Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom Stephanodiscus minutulus (bacillariophyceae). J. Phycol. v.36, 510–522, 2000.

MALGAS. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. Gijón: Ast Ingeniería, p.72, 2013.

MARQUEZ, L. G. E. Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira. 164 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable And Sustainable Energy Reviews, Elsevier BV. v. 14, n. 1, p.217-232, 2010. doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020.

MATTHEW, T.; ZHOU, W.; RUPPRECHT, J.; LIM, L.; THOMAS-HALL, S.R.; DOEBBE, A.; KRUSE, O.; HANKAMER, B.; MARX, U.C.; SMITH, S.M.; The metabolome of Chlamydomonas reinhardtii following induction of anaerobic H2 production by sulfur depletion. J. Biol. Chem., v.284, 23415–23425, 2009.

MENDES, Maria Cristina de Queiroz et al. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. Acta Bot. Bras., Feira de Santana, v.26, n.3, p.691-696, 2012 .

MEYEN F. J. F. Beobachtungen über einige niedere Algenformen. Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae v.14, p.768-778, 1829.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. da. Resposta celular ao estresse. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo , v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

NUNES, M; HENRIQUES V.A. A; PINTO, E; LEAL, C. R.; ANTONIO C. Pesq. Agropec. Bras. v.48, n.8, 2013.

NUR Z. M. S. et al. The Growth Performance of Freshwater *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. in Different Media, Journal of Applied Science and Agriculture v.9, n.11, p. 119–125, 2014.

OILALGAE, 2015. Comprehensive Report on Attractive Algae Product Opportunities – Preview (Updated Feb 2015). Disponível em: <https://secure.clixoo.com/purchase/oilgae/alg_pdt/report.html> Acesso em: 26 jan. 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. II.CULTIVO DE MICROALGAS. 1987. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>. Acesso em: 15 out. 2014.

PAN, Y. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in Desmodesmus. Bioresource Technology, Elsevier BV, v.102, n.22, p.10510-10517, 2011. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.091.

PANCHA, I. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae Scenedesmus sp. CCNM 1077. Bioresource Technology, Elsevier BV, v.156, p.146-154, 2014. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025.

PARK, J; CRAGGS, R. & SHILTON, A. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology v.102, p.35-42. 2011a.

PELISSON, L.; BAHIA F. O.; LANÇAS, F. M. Determinação direta de mono, di e triglicerídeos em biodiesel: análise crítica da metodologia recomendada e sugestões de alteração nos parâmetros experimentais da HT-HRGC, visando estabilidade e consistência das medidas. Sc, Editora Cubo Multimidia. v.4, n.2, p.30-43, 2012. doi.org/10.4322/sc.2012.009.

PULIDO, R; BRAVO, L; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. J. Agric. Food Chem., [s.l.], v.48, n.8, p.3396-3402, ago. 2000. American Chemical Society (ACS). doi.org/10.1021/jf9913458.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. Trends In Food Science & Technology, Elsevier BV, v.6, n.3, p.75-82,1995. doi.org/10.1016/s0924-2244(00)88967-0.

RADMANN, E. M; COSTA, J. A. V; Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO2, SO2 e NO. Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RICHARDSON, K.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. New Phytologist, Wiley-Blackwell, v. 93, n. 2, p.157-191, fev. 1983.. doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb03422.x.

RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Science p.312-351, 2004.

ROCHA, F. D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Rev. Bras. Farmacogn. João Pessoa, v.17, n.4, p.631-639, 2007.

RODOLFI, L; CHINI, Z. R; BASSI, N; PADOVANI, G; BIONDI, N. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. Wiley-Blackwell, v.102, n.1, p.100-112, 2009. doi.org/10.1002/bit.22033.

RODRÍGUEZ-SALINAS, E.; REMACLE, C.; GONZÁLEZ-HALPHEN, D. Green Algae Genomics. Advances em Botanical Research, Elsevier BV, p.187-214, 2012. doi.org/10.1016/b978-0-12-394279-1.00008-9.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 4, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Comunicado técnico - metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, p.4 2007.

SAFAFAR, H; WAGENEN, J. V; MØLLER P. & JACOBSEN C. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. Marine Drug, 2015.

SAMORÌ G; SAMORÌ C; GUERRINI F. & PISTOCCHI R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. Water Research, Elsevier BV, v. 47, n. 2, p.791-801, 2013. doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006.

SANAA, M.M. S; SOHA, S.M. M; EMAD, A S. & GHADA, I. M. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. Asian Pac J Trop Biomed. Aug; v.2, n.8, p.608–615. 2012

SIGEE C. D. Competition and growth environment. Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment. John Wiley, p. 248, 2005.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SOLOVCHENKO, A. E. et al. Stress-induced changes in pigment and fatty acid content in the microalga *Desmodesmus* sp. Isolated from a White Sea hydroid. Russ J Plant Physiol, Pleiades Publishing Ltd. v.60, n.3, p.313-321, 2013. doi.org/10.1134/s1021443713030138.

SONNTAG, B.; SUMMERER, M.; SOMMARUGA, R.. Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic Chlorella-bearing ciliates (Ciliophora). Freshwater Biology, Wiley-Blackwell, v.52, n.8, p.1476-1485, 2007.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01778.x.

SOMMARUGA, R.; TARTAROTTI, B.. A Note of Caution on Using Absolute Methanol Concentrations and Low Temperatures to Quantify Mycosporine-Like Amino Acids in Algae. Journal Of Phycology, [s.l.], v. 38, n. 1, p.33-33, jun. 2002. Wiley-Blackwell. http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.38.s1.94.x.

SOUZA, D. B; Silva E; FELISBERTO, S. A. *Comasiella*, *Desmodesmus*, *Pectinodesmus* e *Scenedesmus* na comunidade perifítica em ecossistema lêntico tropical, Brasil Central. Hoehnea, São Paulo , v.41, n.1, p. 109-120, 2014.

SNIDER D. *et al*. Lipid metabolism. em: Synthesis, storage, and utilization of fatty acids and triacylglycerols. DELVIN T M (Ed). Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Wiley & Sons, p.662-89, 2006.

SRINIVAS, R.; OCHS, C. Effect of UV-A irradiance on lipid accumulation in Nannochloropsis oculata. Photochem. Photobiol. 2012, 88, 684–689.

STEPHENS, Evan et al. Future prospects of microalgal biofuel production systems. Trends In Plant Science, [s.l.], v. 15, n. 10, p.554-564, out. 2010. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.003.

SUH, S.S; HWANG, J; PARK, M; SEO,H.H; KIM, H.S & LEE, J.H. Anti-Inflammation Activities of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Response to UV Radiation Suggest Potential Anti-Skin Aging Activity. Marine Drugs, [s.l.], v. 12, n. 10, p.5174-5187, 14 out. 2014. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/md12105174.

SUREK, B; MELKONIAN, M. CCAC – Culture Collection of Algae at the University of Cologne: A new collection of axenic algae with emphasis on flagellates. Nova Hedwigia, Schweizerbart. v.79, n.1, p.77-92. 2004. doi.org/10.1127/0029-5035/2004/0079-0077.

SUN ZHENG, LI TAO, ZHI-GANG ZHOU, YUE JIANG TINOCO. Microalgae as a Source of Lutein: Chemistry, Biosynthesis, and Carotenogenesis Microalgae Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v.153. p. 37-58. 2015.

TAKAICHI S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. Mar Drugs. v.9, n.6, p.1101-18. 2011. doi: 10.3390/md9061101

TIRZITIS, G.; BARTOSZ, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. Acta Biochimica Polonica, v. 57 n.1, p. 139–142, 2010.

TORRES, P. B. SANTOS, D; FERREIRA, M. J. P. & CHOW F. Mycosporine-like amino acids from *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) and its variation under high light. J Appl Phycol, Springer Science + Business Media, v. 28, n. 3, p.2035-2040. 2015. doi.org/10.1007/s10811-015-0708-0.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S.R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. Bioresource Technology, Elsevier BV, v.129, p.7-11, 2013. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.-C.; JU, Y.-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. J. Taiwan Inst. Chem. Eng, v.40, p.13–20. 2009.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp. Bioresour. Technol. 2010, 101, 5494–5500.

XIA, Ling et al. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. Bioresource Technology, Elsevier BV. v.161, p.402-409, 2014. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.063.

YANG, Haisha et al. Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. Molecules, MDPI AG. v.16, n.12, p.3444-3455, 2011. doi.org/10.3390/molecules16043444.

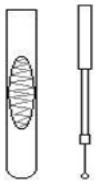
YEH, K; CHANG, J-S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. Biotechnology Journal, Wiley-Blackwell, v.6, n.11, p.1358-1366, 2011. Wiley-Blackwell.doi.org/10.1002/biot.2010004

ANEXO I. Metodologia de isolamento de cepas modificada de SUREK& MELKONIAN (2004).

O protocolo de re-isolamento do cultivo realizou-se conforme descrito abaixo, cabe destacar que todos os passos foram realizados em condições de esterilização dentro de fluxo laminar, utilizando-se de microscópio óptico para verificação de contaminação por outros microrganismos.

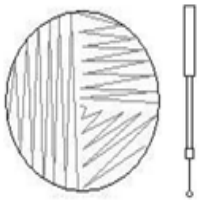
1. Coletou-se uma gota de material desejado e observou-se no microscópio para ter a certeza qual microalga a ser isolada.
2. Com uma pipeta graduada coletou-se 9-10 mL do material, que fora colocado em um microtubo com tampa rosca.
3. Centrifugou-se a velocidade baixa (1.400 rpm) durante 10-15 minutos para separar as bactérias das microalgas. Descartou-se o sobrenadante com ajuda de pipeta Pasteur.
4. A porção centrifugada foi ressuspendida em meio BBM estéril e homogeneizada com pipeta Pasteur.
5. Centrifugou-se mais uma vez nas condições anteriores.
6. Com a pipeta Pasteur, coletou-se uma parte do sobrenadante deixando aproximadamente 3 mL. Observou-se no microscópio se os filamentos ou as células de *Desmodesmus* sp. estavam separados e se a quantidade de bactérias era menor. Após essa verificação, pode-se continuar com o seguinte passo; caso contrário, repetiu-se os passos 4, 5, e 6 até que a concentração de bactérias foi proporcionalmente menor ao número de células de microalga.
7. A amostra de células de microalgas de 3 mL foi colocada em vórtex durante 5-10 segundos, e foi colocada dentro de um tubo com meio líquido BBM. Foi observada de novo no microscópio para ter a certeza que as células estavam separadas.
8. Encheu-se o tubo Falcon com meio BBM estéril até 9-10 mL e o material foi centrifugado pela última vez a 1.400 rpm durante 10-15 minutos. Parte dosobrenadante foi descartado, até 4 mL, e o restante foi homogeneizado com a porção centrifugada.
9. O conteúdo deste último tubo inoculou-se por semeadura em placa de Petri ou tubo de ensaio com tampa rosca com meio BBM e 2% de ágar nutritivo.

9.a)Para o tubo com meio sólido foi usado o método de semeadura em estria sinuosa, que consiste em semear com alça bacteriológica partindo da base para a extremidade da superfície seguindo um formato de zig-zag. Como se mostra na Figura 6.



Anexo 1. Estria sinuosa em tubo.

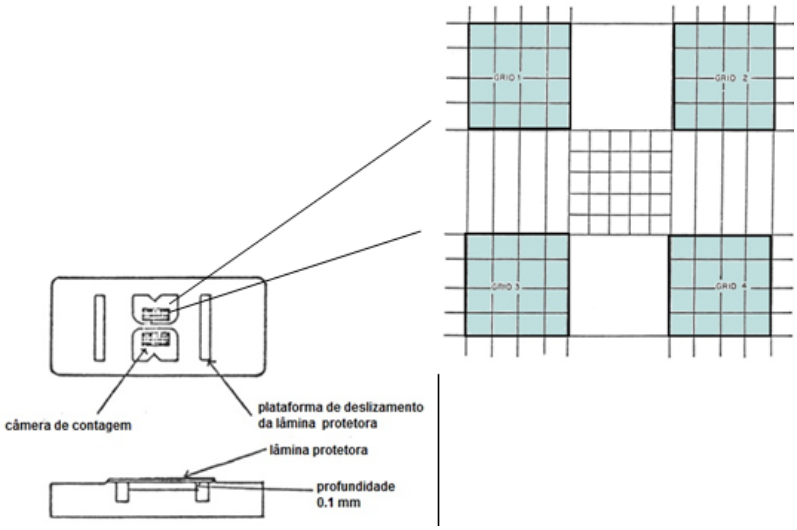
9.b)No caso da semeadura em placa de Petri, o método foi o de estria múltipla, onde a alça bacteriológica com o material é aplicada no meio sólido mediante movimentos de estrias em zig-zag. Para tal, a placa foi dividida em quatro quadrantes, na qual metade da placa foi estriada uniformemente até atingir a metade da placa, logo a placa foi girada em 90° e estriou-se o terceiro quadrante e finalmente o quarto quadrante, de acordo com a Figura 7.



Anexo 2. Estria sinuosa em placa.

10. As réplicas foram deixadas em câmera de cultivo a 25 ± 2ºC, em regime de 24 h dePAR(60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}). Nota: Não se deve levar muitos dias para descartar as placas desfavoráveis, pois as bactérias crescem muito rápido, o desejado é observar todos os dias.

ANEXO II. Esquema de uma câmera de Neubauer.



Anexo 3. Câmara de Neubauer para contagem de células.

ANEXO III. Metodologias para a determinação de glicerídeos totais.

- Procedimento de extração e pré-tratamento das amostras, modificada de RADMANN & COSTA (2008).

Foram pesadas 50 mg da biomassa liofilizada e misturadas com 2 mL de hexano 99% (v/v). O material foi colocado no vórtice por 5 minutos e em seguida centrifugado a 4.400 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recuperado em um microtubo previamente pesado e foi secado com nitrogênio gasoso. O procedimento de extração foi repetido mais duas vezes. O material seco foi ressuspendido em 1,5 mL de hexano grau analítico (Sigma-Aldrich) com adição de metil-heptadecanoato (Spectrum) [0,5 $mg.L^{-1}$] como padrão interno.

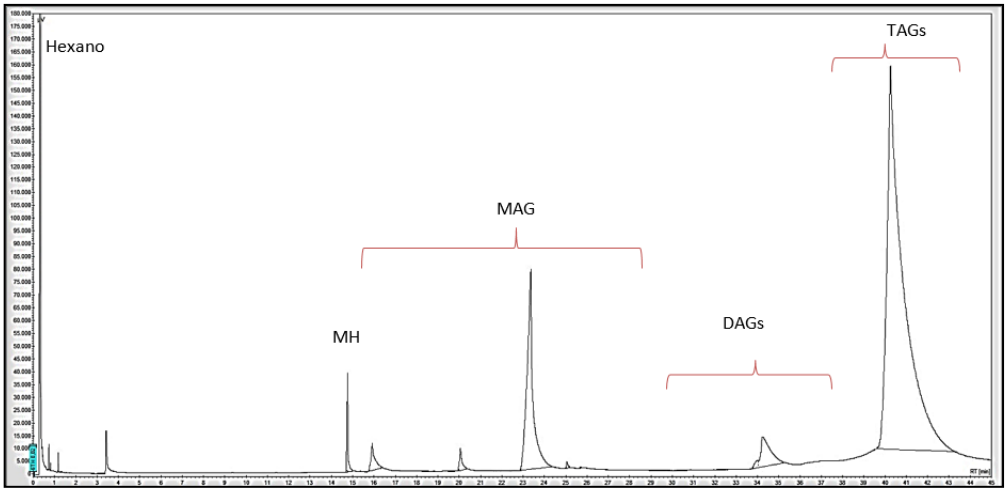
- Curva padrão

A curva de calibração foi realizada com o padrão de Mix com 40 mg mono-di-triglicerídeos que continha 25% monoleina $C_{21}H_40_4$, 50% 1;2- dioleina $C_{39}H_{72}O_5$ e 25% trioleina $C_{57}H_{104}O_6$. Usando metil-hepadecanoato (MHD) como padrão interno, ao igual que as amostras, a região para os monoglicerídeos foi considerada a partir do pico de MHD TR=14,75 min (14-29 minutos), a região dos diglicerídeos (30-39 minutos) e triglicerídeos (40-45 minutos).

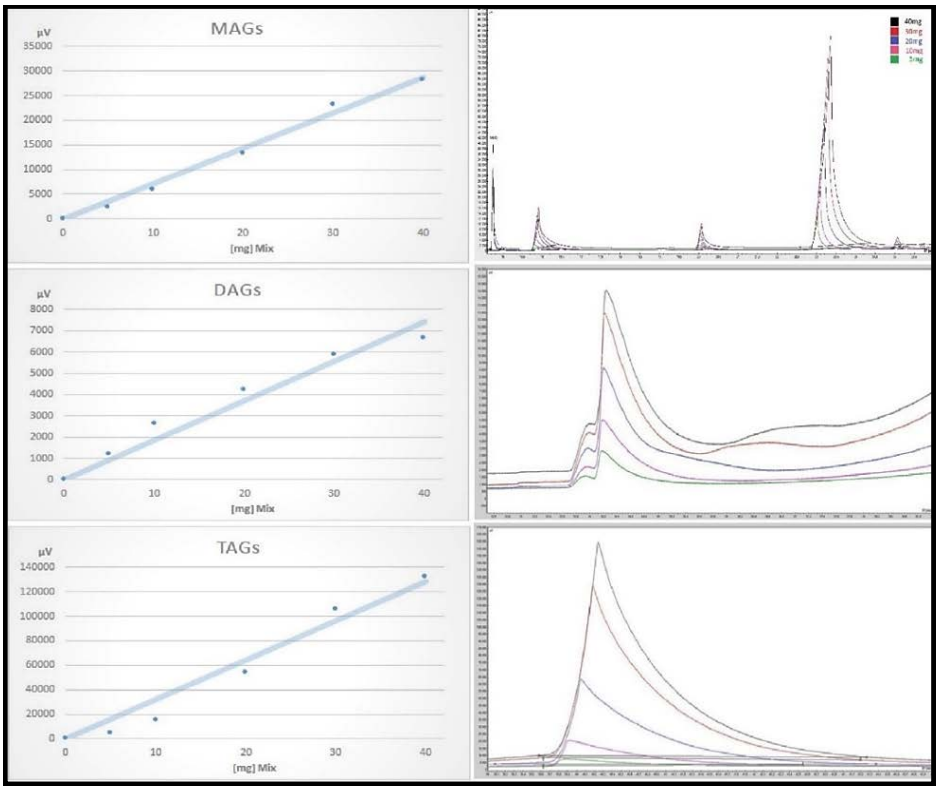
- Método cromatográfico GC-FID para análise de lipídios totais.

A análise qualitativa dos ácidos graxos foi realizada num cromatógrafo gasoso (CG; Bruker SHS-40) com detector FID e uma coluna BR-Biodiesel 10 m, 0,32 mm/ID – 0,10 µm df (Bruker). A metodologia de corrida foi adaptada do método (EN-14105) da Agilent Technologies, com fluxo de 1 mL/min 100°C - 370°C durante 15 min. A programação do forno da coluna foi, inicialmente, 50°C/min, a 180°C a 10°C/min e se manteve por 3 min, seguidamente, a 230°C a 7°C/min e finalmente a 370°C a 10°C/min por 5 min. O gás de arraste utilizado foi hélio, com um fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura no detector FID se manteve a 380°C.

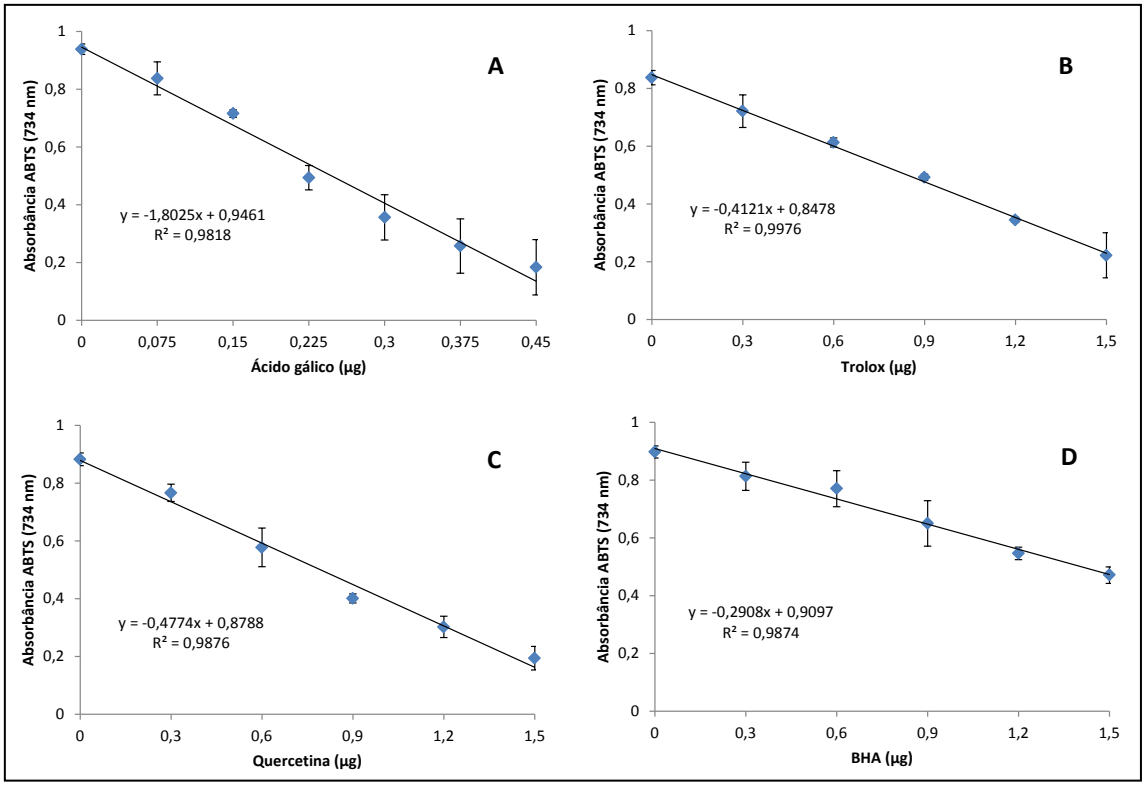
ANEXO IV. Cromatograma do Mix: monoglicerídeos (MAGs), diglicerídeos (DAGs) e triglicerídeos (TAGs) na concentração de 40 mg.mL^{-1}, usando como padrão interno Metil-Heptadecanoato (MHD).



ANEXO V. Curvas de calibração [5-40 mg.mL^{-1}] para monoglicerídeos (MAGs) R^2= 0,99, diglicerídeos (DAGs) R^2= 0,95 e triglicerídeos (TAGs) R^2=0,96.

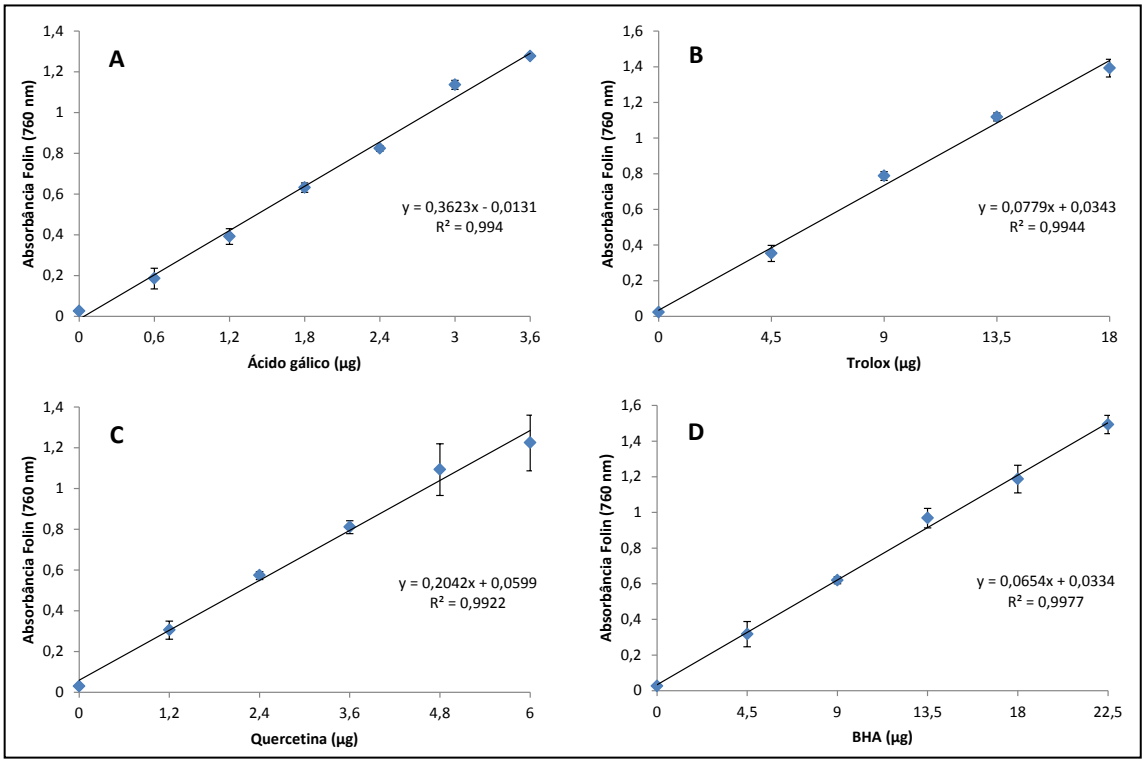


ANEXO VI. Curvas padrões de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA para o ensaio de potencial antioxidante segundo o método de ABTS. Valores de média ± desvio padrão (n = 3).



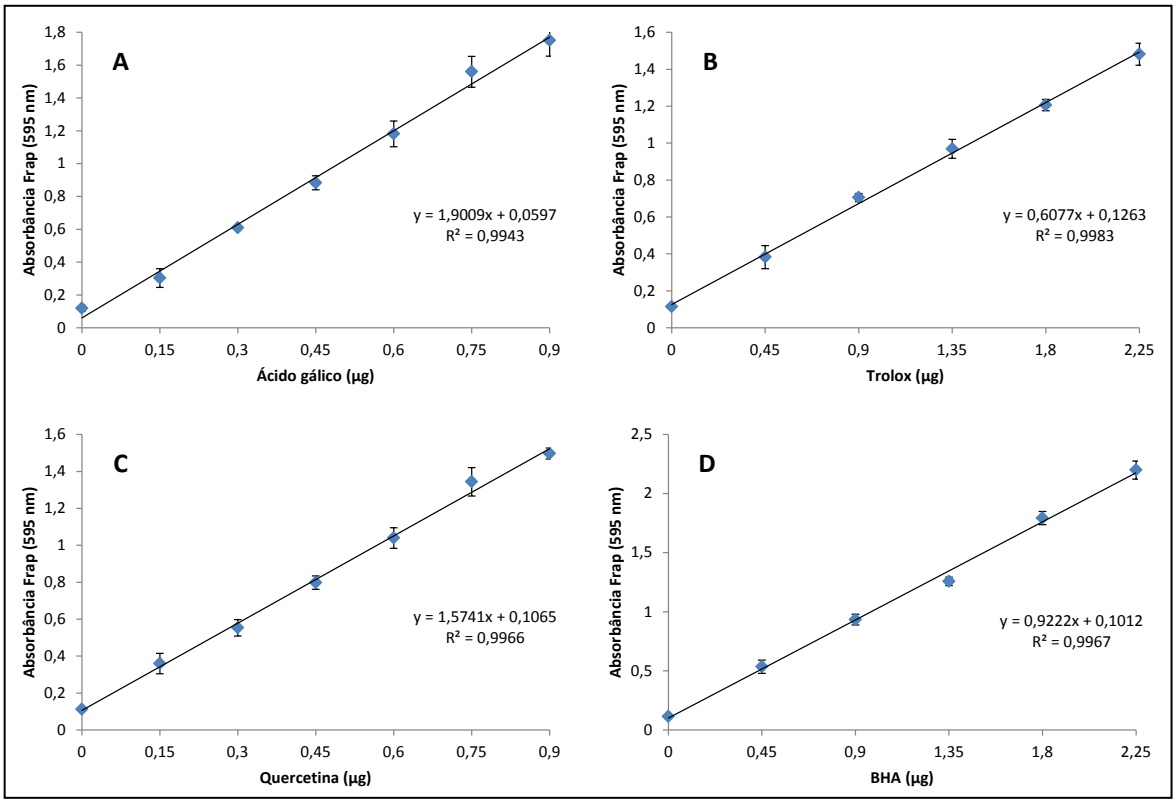
As concentrações utilizadas foram: ácido gálico: 0 - 1,5 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 0,45 µg; trolox: 0 - 5 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 1,5 µg; quercetina: 0 – 5 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 1,5 µg; e BHA: 0 - 5 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 1,5 µg.

ANEXO VII. Curvas padrões de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA para o ensaio de potencial antioxidante segundo o método de Folin-Ciocalteu. Valores de média ± desvio padrão (n = 3).



As concentrações utilizadas para elaborar as curvas padrão foram: ácido gálico: 0 - 12 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 3,6 µg, trolox: 0 - 90 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 18 µg, quercetina: 0 - 20 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 6 µg e BHA: 0 - 90 µg.mL^{-1} equivalente a 0 – 22,5 µg.

ANEXO VIII. Curvas padres de A) ácido gálico, B) trolox, C) quercetina e D) BHA para o ensaio de potencial antioxidante segundo o método de FRAP. Valores de média ± desvio padrão (n = 3).



Semelhante os ensaios anteriores, para o ensaio de Frap foram realizadas curvas padrões com ácido gálico as concentrações seguintes: ácido gálico 0 - 3 $\mu g.mL^{-1}$ equivalente a 0 – 0,9 µg, trolox: 0 – 3 $\mu g.mL^{-1}$ equivalente a 0 – 2,25 µg, quercitina: 0 – 3 $\mu g.mL^{-1}$ equivalente a 0 – 0,9 µg e BHA: 0 – 3 $\mu g.mL^{-1}$ equivalente a 0 – 2,25 µg.