

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica
Laboratório de Biotecnologia de Algas

**Avaliação do efeito da exposição ao cobre e diferentes cores de luz na
composição bioquímica de *Pediastrum* sp.**

Nome de registro: Camila de Almeida Neves

Nome social: Cien Milá Almeida Neves

SÃO CARLOS – SP

2023

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica
Laboratório de Biotecnologia de Algas

**Avaliação do efeito da exposição ao cobre e diferentes cores de luz na
composição bioquímica de *Pediastrum* sp.**

Nome de registro: Camila de Almeida Neves

Nome social: Cien Milá Almeida Neves

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido como requisito para a
obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

SÃO CARLOS – SP

2023

Agradecimentos

Agradeço pelo vasto e intenso campo de emoções que me trouxe até aqui.

Agradeço pela intensidade exuberante dos aprendizados desta jornada. Este é o fim do começo.

Virá mais e mais, daqui até a eternidade.

Agradeço aos meus pais pelo suporte financeiro e emocional, sem o qual nada disso teria ocorrido. Aos meus orientadores, Prof. Dra. Ana Lombardi e Lucas Solidade, que sempre foram tolerantes e solícitos com minhas necessidades, propiciando as condições para meu trabalho e aprendizado.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram pontualmente em algum momento, e hoje não fazem mais parte do convívio, devido ao intenso e natural fluir das coisas. Agradeço principalmente a mim mesmo pela perseverança.

Agradeço também à FAPESP, por meio do processo 2018/07988-5, projeto coordenado pela Profa. Lombardi, e que com ele foi capaz de suportar a pesquisa realizada.

Esta monografia foi o parto de um filho-produção científica (risos).

Graças à minha Fé,

eu não dei ponto sem nó.

Mirei e acertei,

Foi numa flecha só!

Que pai Oxalá ilumine a leitura e a compreensão deste texto.

Dedico este trabalho a todos organismos, humanos e não humanos, bióticos e abióticos, que têm sofrido com a lógica da acumulação. E penalizados em muito para que poucos tenham demais.

Resumo

Microalgas são organismos com diversidade morfológica e filogenética, que apresentam variação em sua composição bioquímica. Essa diversidade confere seu uso em setores de relevância econômica, como o nutricional, farmacêutico e cosmético. Em geral, são empregadas condições ótimas para o crescimento, mas o cultivo pode ser manipulado em suas características físico-químicas, como micronutrientes e condições de luminosidade, para alteração da resposta metabólica da alga e consequente alteração na produção de biomoléculas. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do cobre e de diferentes cores de luz no crescimento e fisiologia da microalga *Pediastrum* sp., com enfoque na produção de biomoléculas. A concentração de cobre utilizada foi correspondente ao EC20, calculado por meio de testes em microplaca de 96 poços com 30 concentrações em faixa de 4.10^{-8} a 9.10^{-4} M cobre nominal, com monitoramento da absorbância 684 nm durante 6 dias. Definida a concentração ($7,5.10^{-7}$ M), foi realizado o experimento de fisiologia algal e determinação de biomoléculas na biomassa em 96 h, incluindo como variável os LEDs azul, vermelho e branco. Após esse período, foram quantificados a clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, proteínas e carboidratos na biomassa. Os resultados mostraram que a luz azul favoreceu a biossíntese de carotenoides e carboidratos e, em associação com o cobre elevado, aumentou significativamente a concentração das clorofilas. O cobre na concentração equivalente ao EC20 influenciou o processo fotossintético, aumentando a dissipação fotoquímica (qP) independente da cor de luz, e a dissipação não-fotoquímica (NPQ) para a luz branca. Os resultados apresentados neste estudo contribuem para a expansão do conhecimento acerca da combinação de cobre e luzes LEDs na fisiologia de algas verdes Chlorophyta (gênero *Pediastrum*), bem como na produção de biomoléculas e biotecnologia de microalgas.

Palavras-chave: *Pediastrum* sp., biomoléculas, pigmentos, fisiologia de microalgas

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivos	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Condições e manutenção de cultivo	12
3.2. Definição da concentração de cobre subletal	13
3.3. Experimento de manipulação bioquímica	13
3.3.1. Monitoramento do crescimento	14
3.5. Pigmentos e Fotossíntese	15
3.6. Determinação de Biomoléculas	16
3.6.1. <i>Proteínas totais</i>	16
3.6.2. <i>Carboidratos totais</i>	16
Figura 6. Fluxograma da metodologia executada.	17
4. Resultados e Discussão	18
4.1. Experimento em microplaca de 96 poços	18
4.2. Taxa de crescimento (μ)	19
4.3. Experimento de manipulação bioquímica, combinação do cobre com cores de luz 21	
4.3.2. <i>Rendimento Máximo e Efetivo</i>	22
4.3.3. <i>Clorofilas A e B</i>	23
4.3.4. <i>Carotenóides totais</i>	25
4.4. Biomoléculas	27
4.4.1. <i>Carboidratos totais</i>	27
4.4.2. <i>Proteínas</i>	28
5. Conclusão	29
6. Referências Bibliográficas	30

Lista de Figuras

Figura 1. Cenóbio da cepa de *Pediastrum* sp. utilizada no presente estudo. Fonte: arquivo pessoal.

Figura 2. Representação esquemática: (1). Cenóbio de *Pediastrum* sp. (2) Cloroplasto da Divisão Chlorophyta. (3) Fotossistemas, localizados nas membranas dos tilacóides, descritos como “centros de reação com vários complexos de captação de luz (complexo antena) periféricos”. O PSII (centro de reação) corresponde a partículas mais largas, de 140-180 Å, enquanto o PSI, à partículas menores, de 70-80 Å. Adaptado de Larkum; Douglas; Raven, 2003). Ilustração autoral.

Figura 3. Cultivo *Pediastrum* sp. em controle de luz (luz branca) com concentração de cobre subletal ($7,5 \cdot 10^{-7}$ M) e cultivo controle com concentração de cobre do meio BG11, em frascos de cultura de tecido.

Figura 4. Cultivo de *Pediastrum* sp. em frascos de cultura de tecido com concentração de cobre subletal e LEDs coloridos.

Figura 5. Gráfico representando a Curva de Kautsky, extraído de Camargo (2020) e adaptado de Masojídek, Vonshak e Torzillo (2010).

Figura 6. Fluxograma da metodologia executada.

Figura 7. Absorbância (684 nm) em função do tempo experimental (para as 30 concentrações de cobre utilizadas no experimento em microplaca).

Figura 8. Taxa de crescimento (μ) dos cultivos nas microplacas para o log da concentração cobre adicionado ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) no meio. Os pontos representam a média e as barras de erro, o desvio padrão da média ($n=3$).

Figura 9. Taxa de crescimento das condições Controle e Cobre ($7,5 \cdot 10^{-7}$ M), para todas as cores de LED. Letras iguais acima das barras indicam diferença não-significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$). Os valores representam a média ($n=3$) e as barras de erro, o desvio padrão da média.

Figura 10. Parâmetros fotossintéticos do experimento de manipulação bioquímica com cobre e cores de luz. (a) Rendimento quântico máximo; (b) Rendimento quântico efetivo; (c) Decaimento fotoquímico; (d) Decaimento não fotoquímico (NPQ). A barra azul corresponde à luz LED azul, a barra vermelha ao LED vermelho e a barra amarela ao LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$). Os valores representam a média ($n=3$) e as barras de erro, o desvio padrão da média.

Figura 11. Concentrações de clorofila *a*. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Figura 11. Concentrações de clorofila *b*. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Figura 13. Concentrações de carotenoides totais. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Figura 14. Concentrações de carboidratos totais. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Figura 15. Concentrações de proteínas. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores de EC10, EC20 e EC50, e suas respectivas concentrações de cobre.

1. Introdução

Microalgas são organismos com diversidade morfológica, filogenética e de composição bioquímica (Miazek et al., 2015). Seu uso vem sendo aplicado nas áreas cosmética, farmacêutica e nutricional, tendo relevância econômica, principalmente devido à produção de biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos carotenoides (Raivanshi *et al.* 2019). Algumas biomoléculas produzidas pelo metabolismo algal podem ser empregadas na alimentação humana e animal, assim como na aquicultura (Lavens, Soergelos, 1996). Contudo, ainda são poucos os gêneros explorados para tais finalidades. Isso ressalta a importância deste estudo, que usou um gênero da divisão Chlorophyta pouco investigado fisiologicamente, *Pediastrum* sp. Esse gênero tem mostrado potencial como produtor de biomoléculas (carboidratos e proteínas), sendo relatado na literatura também devido à biossíntese de polifenóis e compostos antioxidantes (Chisti, 2018; Tippawan & Yuwadee, 2016; Corrêa da Silva et al., 2022).

Além dos estudos fisiológicos envolvendo biomoléculas, o gênero *Pediastrum* (classe Chlorophyceae, família Hydrotyaceae) é utilizado para pesquisas paleoecológicas e paleoclimáticas (Huang et al. 2023). Morfologicamente, suas células são sésseis e o talo é colonial, formando cenóbios de 4 a 64 células, arranjados em fileiras únicas, organizadas em anéis concêntricos (Guiry & Guiry, 2023). Na figura 1, há um registro de imagem da cepa utilizada (autoral), com um cenóbio de 16 células.

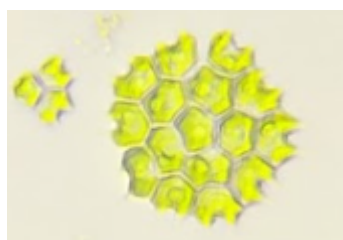


Figura 1. Cenóbio da cepa de *Pediastrum* sp. utilizada no presente estudo.

Fonte: arquivo pessoal.

A literatura reporta que, para o crescimento de microalgas, é necessário empregar condições específicas de cultivo, com temperatura, pH, luminosidade e composição bioquímica do meio de cultivo definidas (Zhu, 2015). Entretanto, tais condições podem

ser manipuladas para alteração da resposta metabólica da alga e consequente alteração na produção/acúmulo de biomoléculas. Essa resposta já foi observada em microalgas, favorecendo a exploração de aplicações biotecnológicas (Baracho, Silva, Lombardi 2019; Chia, Galadima, Japhet 2015).

O cultivo de microalgas deve fornecer micronutrientes em forma biodisponível, sendo o mesmo necessário para o crescimento da alga. O cobre, por exemplo, é demandado em concentrações-traço, sendo componente de coenzimas e cofatores (Lourenço, 2006) e fundamental ao processo fotossintético, que transforma a energia solar em química (biomassa) nas microalgas (Lombardi e Maldonado, 2011). Em concentrações elevadas, é apontado como potencializador da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e prejudicial ao aumento populacional dos cultivos (Cavalletti *et. al*, 2022; Lombardi e Maldonado 2011; Lourenço, 2006). Assim, exposições à diferentes concentrações de cobre levam a respostas fisiológicas, enquanto mecanismo de defesa (Magdaleno et al., 2014). Este efeito vem sendo observado em algas como *Chlorolobion braunii*, levando a aumentos na produtividade de proteínas, carboidratos e lipídios intracelulares (Baracho; Silva; Lombardi, 2019) com emprego de concentração subletal de cobre.

A manipulação de microalgas se apresenta, portanto, relevante nos setores da biotecnologia e da ecologia. Na ecologia, principalmente devido ao fato do cobre ser difundido na natureza, que recebe ainda o metal por ação antropogênica por uso de fertilizantes, pesticidas, tintas anti-incrustantes e resíduos industriais (Cavalletti, 2022). Na questão da biotecnologia, a manipulação de microalgas caracteriza-se como uma estratégia para o aumento de produção de biomoléculas e, agregando valor ao produto. Além desses fatores químicos, fatores físicos como a qualidade de luz podem afetar a produção de biomoléculas. Luz é crucial para o desenvolvimento das microalgas fotossintéticas, pois é fundamental à fotossíntese. Nas algas verdes a presença de clorofilas *a* e *b* permite absorção de luz principalmente nos comprimentos de onda do azul e do vermelho (Björn et al., 2009), que estão presentes na composição da luz visível.

Os carotenoides possuem função de pigmentos acessórios e fazem parte dos fotossistemas I e II, que também contém as clorofilas, realizando a captação de fótons para conversão de energia via fotossíntese (Masojidek; Torzillo; Koblížek, 2013). O

comprimento de onda e o tipo de luz utilizado para o crescimento algal em laboratório é discutido na literatura, e as diferentes espécies podem apresentar diferentes respostas a estes parâmetros. Prates *et al.* (2020) observaram que *Spirulina* sp. produziu maior quantidade de proteínas em exposição à diodos emissores de luz (LED) vermelho. Teo *et al.* (2014) aumentaram as taxas de crescimento e acúmulo de lipídios em *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. por meio da exposição das algas à luz azul. *Chlorella vulgaris* apresentou uma maior taxa de crescimento em luz vermelha (Satthong *et al.*, 2019). No mesmo gênero (*Chlorella* sp.), a atividade da luz azul foi apontada como favorável para a síntese de clorofila e formação dos cloroplastos (Amaro *et al.*, 2020).

Ainda sobre a fotossíntese oxigênica, este processo metabólico transformou completamente a atmosfera terrestre e é a maneira pela qual muitos autótrofos produzem biomassa, convertendo energia luminosa em energia química. Nas algas e vegetais, a conversão ocorre nos fotossistema I (PSI) e fotossistema II (PSII). A Figura 2 é uma ilustração da microalga cultivada no presente estudo, esquematizando a estrutura celular onde ocorre a fotossíntese.

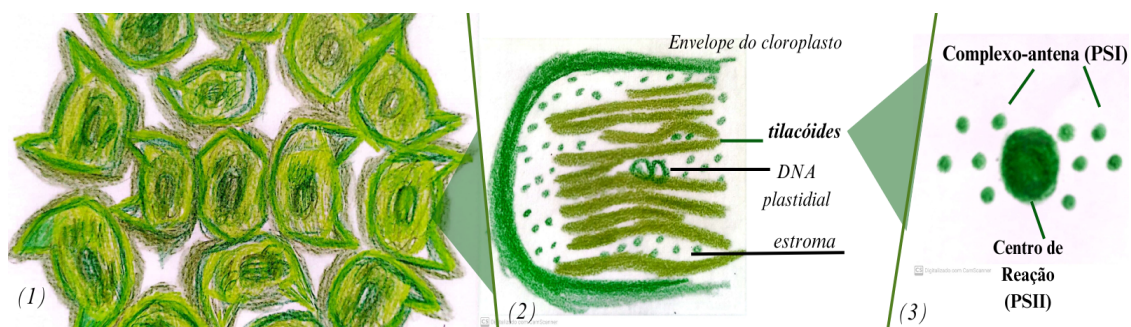


Figura 2. Representação esquemática: (1). Cenóbio de *Pediastrum* sp. (2) Cloroplasto da Divisão Chlorophyta. (3) Fotossistemas, localizados nas membranas dos tilacóides, descritos como “centros de reação com vários complexos de captação de luz (complexo antena) periféricos”. O PSII (centro de reação) corresponde a partículas mais largas, de 140-180 Å, enquanto o PSI, à partículas menores, de 70-80 Å. Adaptado de Larkum; Douglas; Raven, 2003). Ilustração autoral.

A fotossíntese usa como fonte de energia a luz solar, absorvendo seus fótons e utilizando a água como agente redutor. De maneira geral, as membranas tilacóides contém vários componentes estruturais, além dos fotossistemas, incluindo complexos maiores,

como a ATP sintase e o citocromo b6f. A transferência de elétrons entre o citocromo b6f e o PSI é intermediada pela plastocianina, uma proteína em cuja composição se encontra o cobre (Masojidek; Torzillo; Koblížek, 2013). Dado que o cultivo *in vitro* da alga gera respostas fisiológicas às diferentes condições de crescimento, a fotossíntese, o crescimento, e biomoléculas serão aqui investigados. A hipótese deste estudo é de que o elemento cobre (fator químico) combinado a um fator físico (cores de luz) pode levar a um efeito sinérgico, favorecendo o acúmulo de biomoléculas ou causando alterações fisiológicas significativas na microalga *Pediastrum* sp.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito do cobre e de diferentes cores de luz sobre o crescimento e fisiologia da microalga *Pediastrum* sp. com enfoque na produção de pigmentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de cobre para o experimento de manipulação bioquímica utilizando a metodologia de crescimento em microplaca de 96 poços;
- Quantificar o conteúdo de proteínas e carboidratos em diferentes condições de cultivo;
- Avaliar eventuais alterações na capacidade fotossintética de *Pediastrum* sp. sob diferentes condições de cultivo;
- Determinar se há um efeito sinérgico do cobre e diferentes cores de luz em *Pediastrum* sp. quanto aos aspectos fisiológicos investigados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Condições e manutenção de cultivo

A cepa utilizada de *Pediastrum* sp. (CH007) é proveniente da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e foi mantida em meio BG11 (Rippka et al., 1979). Todos os cultivos foram mantidos a 25 ± 1 °C sob iluminação constante na intensidade $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro.

3.2. Definição da concentração de cobre subletal

A definição da concentração de cobre para a exposição em dose subletal foi escolhida a partir de uma varredura com 30 concentrações de cobre distintas. Para isso, as concentrações de cobre utilizadas variaram entre 4.10^{-8} a 9.10^{-4} mol.L⁻¹ de cobre nominal e foram testadas em microplacas de 96 poços. O monitoramento do crescimento ocorreu em espectrofotômetro nos comprimentos de 684 e 570 nm, com densidade de células inicial de 5.10^4 células/mL a partir de contagem em microscópio (BEL Photonis, Somaini Design, Italy) utilizando câmera de Fuchs-Rosenthal.

Como controle, foi utilizada a concentração nominal normal de cobre do meio BG11 (4.10^{-8} M). A taxa de crescimento dos cultivos em microplacas foi calculada pela regressão linear do logaritmo natural da absorbância mensurada (eixo Y) *versus* o tempo experimental (eixo X). Na fase exponencial, a inclinação da reta representa a taxa de crescimento específica (μ) em d⁻¹. A medida EC (Efeito-Concentração) é utilizada em ecotoxicologia para monitorar, no caso de microalgas, a porcentagem de uma população de organismo-teste que é afetada em 10% (EC10), em 20% (EC20) e em 50% (EC50) por uma variável ou agente estressor (Azimonti et al., 2015). No caso deste estudo, o agente escolhido foi o cobre. O cálculo dos valores de EC10, EC20 e EC50 foram feitos a partir da taxa de crescimento. Prosseguiu-se então ao experimento de manipulação bioquímica.

3.3. Experimento de manipulação bioquímica

O experimento de manipulação bioquímica foi feito a partir da exposição das células ao cobre em concentração equivalente ao EC20 ($7,5.10^{-7}$ M) e LEDs de cores branca, azul e vermelha (Figura 4). O controle foi feito em luz branca (Figura 3) e na concentração de cobre normalmente presente no BG11. Além disso, foi feito um controle de luz, com luz branca e cobre EC20. Todos os tratamentos foram feitos com 3 réplicas experimentais.

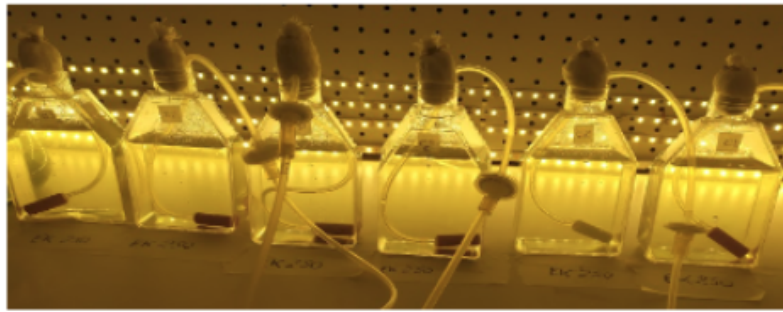


Figura 3. Cultivo *Pediastrum* sp. em controle de luz (luz branca) com concentração de cobre subletal ($7,5 \cdot 10^{-7}$ M) e cultivo controle com concentração de cobre do meio BG11, em frascos de cultura de tecido.



Figura 4. Cultivo de *Pediastrum* sp. em frascos de cultura de tecido com concentração de cobre subletal e LEDs coloridos

Os cultivos foram iniciados com densidade celular $5 \cdot 10^4$ células/mL e distribuídos em frascos de cultura de tecido com 250 mL de capacidade e volume de 200 mL. Estes foram mantidos em condição de intensidade luminosa equivalente ao Ek ($250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) independente da cor da luz usada. Os cultivos foram aerados com ar ambiente filtrado ($0,22 \mu\text{m}$) e o experimento foi finalizado em 96 h.

3.3.1. Monitoramento do crescimento

O crescimento populacional foi monitorado por meio de fluorescência *in vivo* e densidade ótica em 684 e 570 nm (espectrofotômetro digital (NANOCOLOR, Macherey-Nagel, Alemanha). A fluorescência *in vivo* foi mensurada utilizando um fluorímetro digital

(Turner Designs, Trilogy, EUA) após a amostra ser ambientada por 15 min no escuro. A taxa de crescimento foi obtida como descrito no item 3.2.

3.5. Pigmentos e Fotossíntese

3.5.1. Pigmentos: Clorofila *a*, *b* e carotenoides totais

A quantificação da clorofila *a*, *b* e carotenoides totais se deu a partir de filtragem de 3 mL de cultura em filtros de acetato de celulose de 25 mm e porosidade 0,22 μm . Aos filtros foi adicionado 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução foi mantida no escuro durante 45 minutos. Após este período foi feita a determinação da absorvância nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm e as concentrações dos pigmentos calculadas de acordo com as equações 1, 2 e 3, descritas em Wellburn (1994) e transcritas a seguir.

$$C_a = 12,47 \cdot A_{665} - 3,62 \cdot A_{649} \quad (1)$$

$$C_b = 25,06 \cdot A_{649} - 6,5 \cdot A_{665} \quad (2)$$

$$CT = [(1000 \cdot A_{480}) - (1,29 \cdot C_a) - (53,78 \cdot C_b)] / 220 \quad (3)$$

3.5.2. Fotossíntese: Rendimento máximo e efetivo

Para o rendimento quântico máximo e efetivo (Figura 4) foi utilizado o equipamento de fluorescência de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz, Alemanha). As amostras foram submetidas à análise após 15 min de aclimação no escuro, de acordo com o procedimento descrito em Lombardi e Maldonado (2011). A partir destes dados, foram calculados o rendimento quântico máximo, diariamente, e o rendimento quântico efetivo (equação 4), o qP (dissipação fotoquímica), e NPQ (dissipação não-fotoquímica) ao fim do cultivo, em 96 h.

$$\text{Rendimento quântico efetivo} = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_s) / F'_m \quad (4)$$

O mecanismo de ação do PhytoPAM é mostrado na figura 4. O gráfico mostra o sinal mínimo de fluorescência (F_0), o valor máximo de fluorescência após um pulso de luz saturante (F_m), sendo que a diferença entre ambos resulta na fluorescência variável máxima (F_v). Na fase, que pode ser referida como fase lenta, após os pulsos sequenciais

de luz actínica, será gerado um valor de fluorescência basal (F_s) e máxima (F'_m), cuja diferença entre ambos é representada por ΔF .

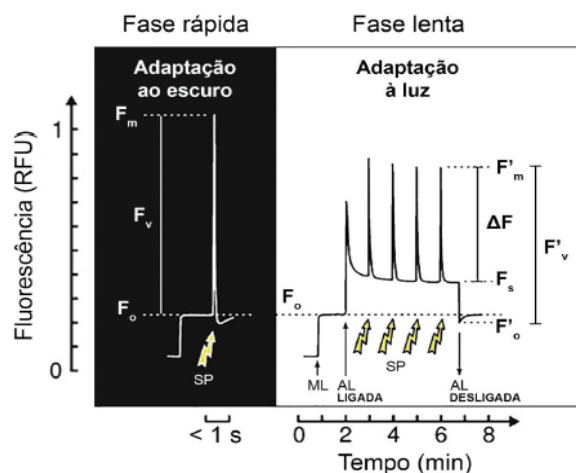


Figura 5. Gráfico representando a Curva de Kautsky, extraído de Camargo (2020) e adaptado de Masojídek, Vonshak e Torzillo (2010).

O NPQ é a diferença entre a fluorescência máxima (F_m) e a fluorescência variável máxima (F'_m), fracionado pela F'_m , valores obtidos a partir das fases rápida e lenta resultantes dos diferentes tipos de estímulos luminosos aplicados na amostra pelo PhytoPAM.

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (5)$$

3.6. Determinação de Biomoléculas

3.6.1. Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi feita com 10 mL das culturas, as quais foram centrifugadas em 4000 rpm por 10 minutos e o pellet congelado até o momento da análise. O procedimento foi feito de acordo com o protocolo descrito por Slocombe et al. (2013).

3.6.2. Carboidratos totais

Foram centrifugados 30 mL das amostras, submetidos às mesmas condições de centrifugação e congelamento que a amostra para proteínas. A análise dos carboidratos

totais foi feita de acordo com o método descrito em Albalasmeh *et al.* (2013), utilizando ácido sulfúrico concentrado. A glicose foi utilizada para a curva de calibração, e a absorbância determinada em espectrofotômetro digital em 315 nm.

3.7. Análise dos dados

O modelo estatístico adotado foi a análise de variância em 2 vias (Two-way ANOVA) a partir do software GraphPad, com significância de $p < 0,05$. Os dados de todos os tratamentos foram analisados simultaneamente. O cálculo do EC50 e EC20 utilizou o mesmo software. Apresenta-se a seguir, um fluxograma da parte metodológica deste TCC.

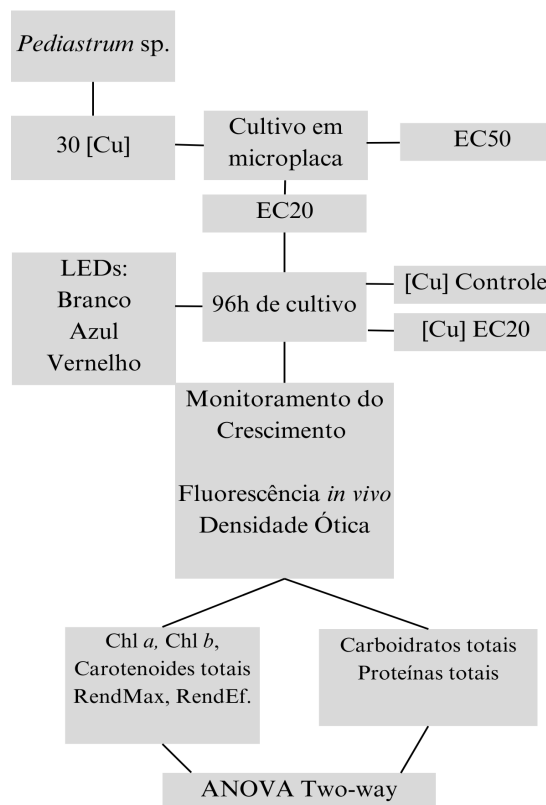


Figura 6. Fluxograma da metodologia executada.

4. Resultados e Discussão

4.1. Experimento em microplaca de 96 poços

Neste experimento foi avaliado o efeito de 30 concentrações de cobre sobre o crescimento da microalga *Pediastrum* sp. e foram elaboradas curvas de crescimento com base em cada concentração avaliada. As curvas de crescimento (figura 6) obtidas no experimento da microplaca são mostradas a seguir.

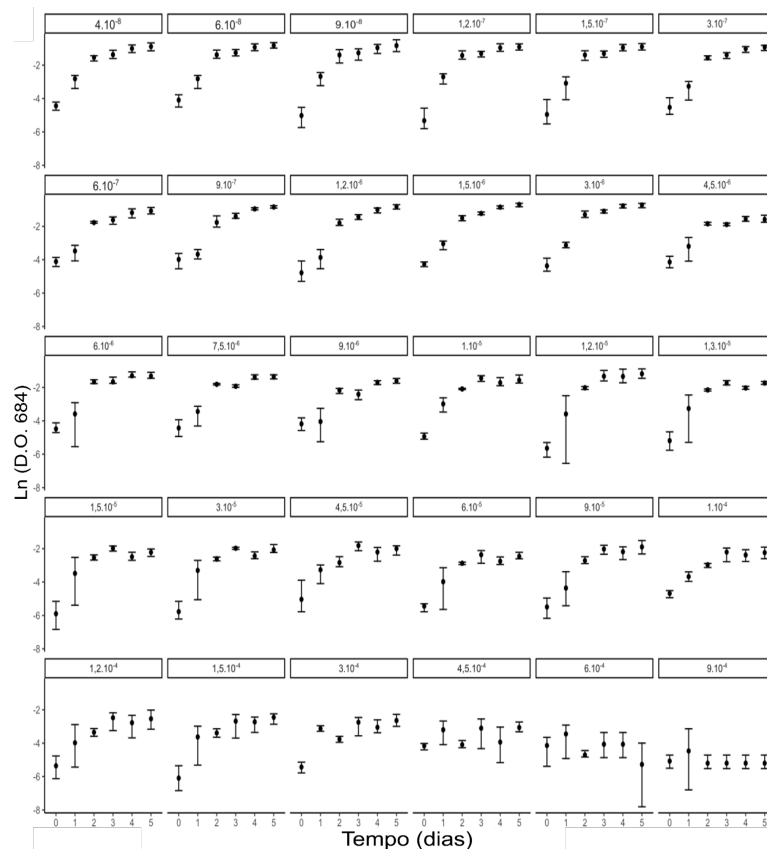


Figura 7. Absorbância (684 nm) em função do tempo experimental (para as 30 concentrações de cobre utilizadas no experimento em microplaca).

Nossos resultados mostram que a partir da concentração $1,3 \cdot 10^{-5}$ M de cobre houve redução do crescimento populacional. Observou-se também que entre o tratamento 1 ($4 \cdot 10^{-8}$ M Cu^{2+}) e o tratamento 18 ($1,3 \cdot 10^{-5}$ M Cu^{2+}), a fase exponencial de crescimento perdurou até 48 h de cultivo. Observamos que as mudanças no padrão das curvas de crescimento são acompanhadas de aumento da variação dos dados, indicando pontos em que a condição química do meio de cultivo poderia estar afetando o crescimento

populacional. A mensuração mais precisa deste efeito pode ser verificada a partir das alterações na taxa de crescimento.

4.2. Taxa de crescimento (μ)

A partir das curvas de crescimento mostradas na figura 7, foram calculados os valores de EC10, EC20, EC50, correspondentes à porcentagem de inibição do crescimento populacional da alga expostas ao cobre. Tais valores são mostrados na tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Valores de concentração de cobre que ocasionaram redução da população (EC10, EC20, EC50) e suas respectivas concentrações de cobre (M).

EC	[Cu]
EC10	$9,8 \cdot 10^{-8}$
EC20	$7,5 \cdot 10^{-7}$
EC50	$2,3 \cdot 10^{-5}$

A realização de cultivos de espécies de microalga em diferentes concentrações de metais é capaz de prospectar e distinguir cepas cobre-sensitivas e cobre-tolerantes (Levy et al., 2008). Oliveira (2023) mostrou que as ordens de inibição do crescimento populacional para a microalga *Ankistrodesmus fusiformis* foi de $6,8 \cdot 10^{-6}$ M (EC15). Estudando a microalga *Kirchneriella contorta*, Aoyagi (2020) mostrou EC20 de $5,7 \cdot 10^{-6}$ M de cobre. Ambas as algas verdes estudadas são de famílias distintas à de *Pediastrum* sp. Dado que a concentração correspondente ao EC20 para *Pediastrum* sp. foi de $7,5 \cdot 10^{-7}$ M, pode-se dizer que a cepa usada nesta pesquisa apresenta menor tolerância ao cobre em comparação com as anteriormente citadas.

A Figura 7, em que foram plotadas as taxas de crescimento obtidas no experimento da microplaca em função do logaritmo (base 10) das concentrações de cobre

(4.10^{-8} M até 9.10^{-4} M) testadas mostra o efeito do metal no crescimento populacional de *Pediastrum* sp.

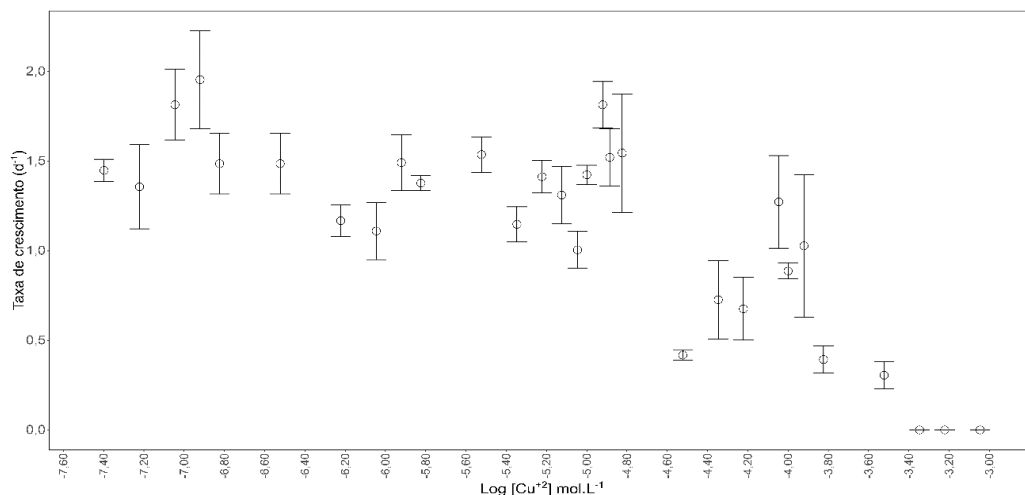


Figura 8. Taxa de crescimento (μ) dos cultivos nas microplacas para o log da concentração cobre adicionado (mol.L^{-1}) no meio. Os pontos representam a média e as barras de erro, o desvio padrão da média ($n=3$).

Observamos um platô de taxas de crescimento até a contração de cobre onde se inicia efeito tóxico e redução da taxa de crescimento é obtida, o que está de acordo com a literatura (Baracho et al., 2019; Silva et al, 2018; Lombardi e Maldonado 2011). O monitoramento do crescimento dos cultivos é importante para verificar como a cepa responde à cada concentração especificamente. O efeito acentuado de toxicidade do cobre pode ser observado a partir do tratamento 26 ($1,2.10^{-4}$ M Cu^{2+}), em que a taxa de crescimento é inferior a $0,39 \text{ d}^{-1}$, e a inibição completa do crescimento ocorre no tratamento 28 em diante ($4,5.10^{-4}$ M Cu^{2+}). Observa-se que nas concentrações de cobre de 9.10^{-8} e $1,2.10^{-7}$ M, foram obtidos os maiores valores de taxa de crescimento, $1,81$ e $1,95 \text{ d}^{-1}$ respectivamente. Em comparação com três espécies de microalgas analisadas em Levy et al. (2008), a microalga *Pediastrum* sp. apresentou taxa de crescimento semelhante à *Phaedactylum tricornutum* em condição controle, em que as divisões diárias foram de $1,78 \text{ d}^{-1}$.

As taxas de crescimento deste trabalho são corroboradas pelos resultados encontrados para *Ankistrodesmus fusiformis*, em que a maior taxa de crescimento foi obtida em cultivo com concentração de cobre superior ao controle (Oliveira, 2023). Isso

pode ter ocorrido por conta da presença de ligante sintético no meio de cultura BG11, que ao se ligar aos micronutrientes, pode torná-los menos disponíveis.

4. 3. Experimento de manipulação bioquímica, combinação do cobre com cores de luz

Os resultados relativos às taxas de crescimento (Figura 8) mostram a resposta de *Pediastrum sp.* nas diferentes condições de luminosidade e nas concentrações de cobre controle e equivalente ao EC20 ($7,5 \cdot 10^{-7}$ M).

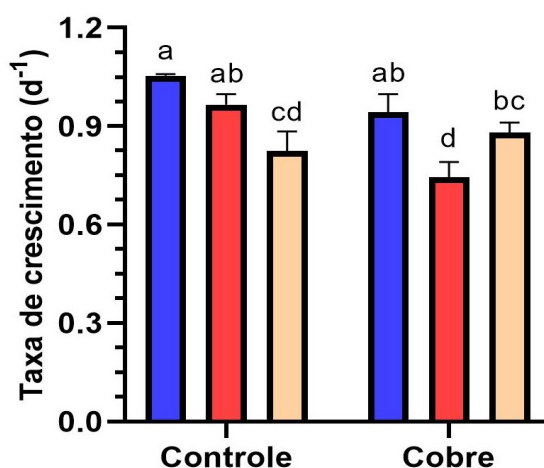


Figura 9. Taxa de crescimento das condições Controle e Cobre ($7,5 \cdot 10^{-7}$ M), para todas as cores de LED. Letras iguais acima das barras indicam diferença não-significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$). Os valores representam a média ($n=3$) e as barras de erro, o desvio padrão da média.

A figura 9 mostra que a concentração de cobre subletal diminuiu a taxa de crescimento para a luz vermelha, ficando no mesmo patamar que a luz branca no controle. Não houve diferença significativa na taxa de crescimento para os cultivos com LED azul, evidenciando que a concentração de cobre não alterou este parâmetro. O mesmo pode ser observado para a luz branca.

Pequenas variações nas taxas de crescimento são esperadas e, de acordo Aoyagi (2020), a luz azul pode levar a aumento nas taxas de crescimento, efeito reproduzido neste

trabalho, ao comparar o parâmetro na condição de cobre controle para o LED azul com o LED vermelho exposto ao cobre subletal.

4.3.2. Rendimento Máximo e Efetivo

A figura 10 mostra os rendimentos quânticos fotossintéticos máximo e efetivo, e os decaimentos, fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (NPQ).

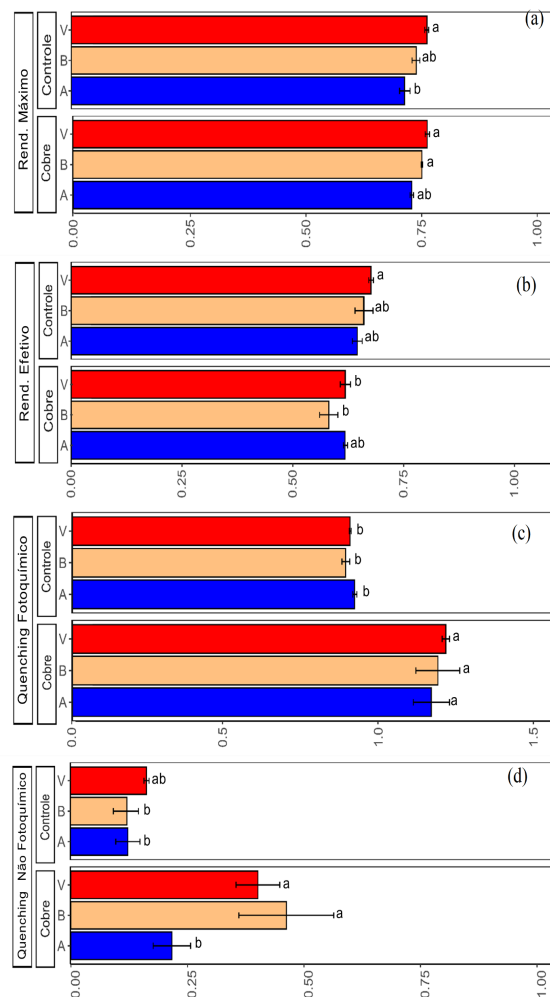


Figura 10. Parâmetros fotossintéticos do experimento de manipulação bioquímica com cobre e cores de luz. (a) Rendimento quântico máximo; (b) Rendimento quântico efetivo; (c) Decaimento fotoquímico; (d) Decaimento não fotoquímico (NPQ). A barra azul corresponde à luz LED azul, a barra vermelha ao LED vermelho e a barra amarela ao LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$). Os valores representam a média ($n=3$) e as barras de erro, o desvio padrão da média.

Pode-se observar que o cobre foi responsável por um aumento do decaimento fotoquímico em todas as cores de luz, sugerindo que mais energia estava sendo direcionada para a fotoquímica da fotossíntese. Em relação ao quenching não-fotoquímico, que corresponde à dissipação da energia na forma de calor, observou-se aumento somente nas cores de luz vermelha e branca nos tratamentos com cobre adicionado, em comparação ao controle e luz azul. Os resultados de NPQ para as demais condições de luminosidade não foram significativamente diferentes.

Quanto ao rendimento quântico, tanto efetivo como máximo, com o cobre ou na situação controle, podemos assumir que não foram estatisticamente diferentes. Apesar disso, de maneira geral, a resposta adaptativa de *Pediastrum* sp. foi mais claramente influenciada pelo cobre, devido ao qP observado. De acordo com Perales-Vela et al. (2007), que cultivou *Scenedesmus incrassulatus* em valor de cobre equivalente ao EC50, foi constatado estímulo da fotossíntese, mas o crescimento foi inibido em 54%. Para *Chlorolobion braunii*, Baracho (2018) mostrou queda nos rendimentos fotossintéticos em exposição à $5 \cdot 10^{-6}$ M de cobre livre, mas sem alteração em concentrações mais baixas, concordantes com os dados de Echeveste, Silva e Lombardi (2017). Os dados de quenching fotoquímico sustentam que pode ter havido estímulo da fotossíntese também para a *Pediastrum* sp., ainda que a exposição ao cobre tenha sido menor que para a espécie comparada.

4.3.3. Clorofilas A e B

Sabe-se que fatores como estresse químico e físico podem levar a alterações na composição destes pigmentos e, de acordo com Perales-Vela et al. (2007), o processo fotossintético depende do conteúdo de pigmentos. As figuras 11 e 12 mostram a concentração de clorofila *a* e clorofila *b* obtidos nos experimentos realizados.

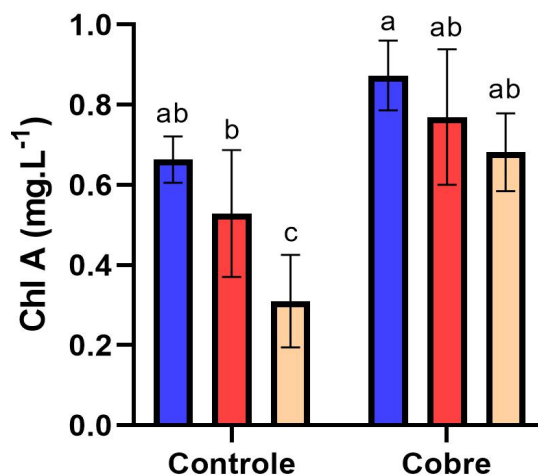


Figura 11. Concentrações de clorofila *a*. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

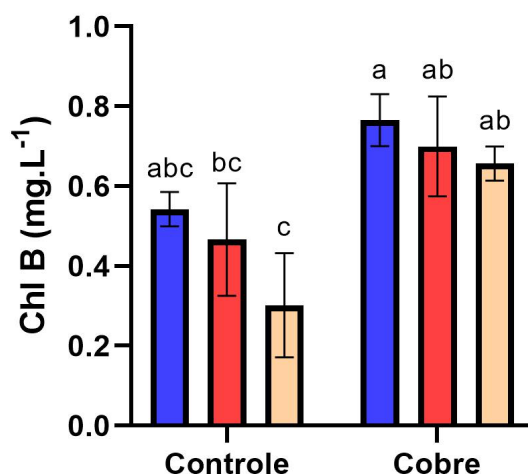


Figura 12. Concentrações de clorofila *b*. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

As figuras 11 e 12 mostram as concentrações de pigmentos fotossintéticos, clorofilas *a* e *b* respectivamente. Para ambas as clorofilas, observou-se que na situação controle de cobre, as luzes de cores vermelha e azul estimularam o acúmulo dos pigmentos, enquanto que na presença do cobre, não constatamos diferença significativa entre os tratamentos. Mas, em geral nos tratamentos com o metal, a concentração dos pigmentos foi cerca de 1,4x maior do que na situação controle. Esses resultados permitem especular que a maior concentração de cobre pode intensificar a biossíntese das clorofilas, fundamentais à fotossíntese favorecendo assim o transporte de elétrons (Molina, 2001; Larkum; Douglas; Raven, 2003). Um dos possíveis fatores que pode explicar isto é a transferência de elétrons entre o citocromo *b6/f* e o PSI, que é intermediada pela plastocianina, uma metaloproteína que apresenta íons cobre em sua composição (Masojidek, Torzillo e Koblízek, 2013).

4.3.4. Carotenóides totais

Os carotenóides exercem função protetiva aos fotossistemas, absorvendo excesso de energia (Larkum; Douglas; Raven, 2003). É esperado que exposição à diferentes cores de luz alterem a biossíntese desses pigmentos pelas microalgas. A figura 13 mostra os valores de concentração de carotenóides totais para os tratamentos.

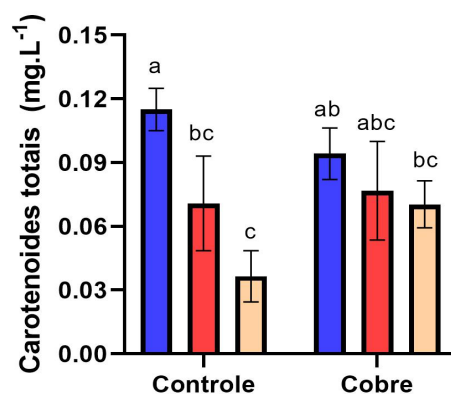


Figura 13. Concentrações de carotenóides totais. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

De acordo com o apresentado na figura 13, a luz azul no cultivo controle estimulou a biossíntese de carotenóides, sendo 1,3x superior à concentração no tratamento com cobre subletal e 4x maior do que o produzido sob luz branca. A luz azul corresponde a um comprimento de onda mais energético e, por isso, mais penetrante no meio e nas células algais. Isso pode ter estimulado um sistema protetivo dos fotossistemas, por meio do aumento de carotenoides (Schulze et al. 2016). Conjuntamente, a concentração de carotenóides foi menor significativamente no cultivo com luz branca, como pode ser visto na figura 13. Os dados de Xu e Harvey (2019) para a microalga *Dunaliella salina*, em condições de cultivo com as mesmas cores de luz empregadas neste trabalho, indicaram o controle da biossíntese de carotenoides no cultivo com luz vermelha como favorável na redução de espécies reativas de oxigênio. Essa observação pode ser extrapolada para nossos resultados relativos à exposição ao LED azul, visto que nela houve maior concentração de carotenoides na situação controle de cobre. De acordo com Masojidek; Torzillo e Koblížek (2013), a regulação da absorção de energia luminosa que incide sobre os fotossistemas é regulada por transcrição e tradução de proteínas. Assim, dado que o cobre está presente em moléculas importantes para o transporte de elétrons na fotossíntese e que os carotenoides exercem função protetiva contra irradiância luminosa excessiva, destacamos que o aumento dos carotenoides pode estar associado à processos de proteção dos fotossistemas.

Estes resultados remetem aos parâmetros fotossintéticos (tópico 4.3.2), em que houve aumento do quenching não-fotoquímico em cultivo com o LED branco e vermelho associados ao cobre subletal. Isso pode indicar uma resposta fotoprotetiva em que maior quantidade de energia captada é dissipada na forma de calor, processo que pode ter sido intermediado por um pigmento acessório, como os carotenoides. Portanto, é possível afirmar, ainda, que a concentração de cobre equivalente ao EC20 pode ter induzido uma maior sensibilidade da microalga à luz.

4.4. Biomoléculas

4.4.1. Carboidratos totais

Os carboidratos apresentam um papel estrutural fundamental para as microalgas, podendo atuar como reserva energética nas Chlorophyta (Baracho; Silva; Lombardi 2019). No presente estudo alterações na concentração de carboidratos pela microalga *Pediastrum* sp. foram obtidas, como mostrado na figura 14.

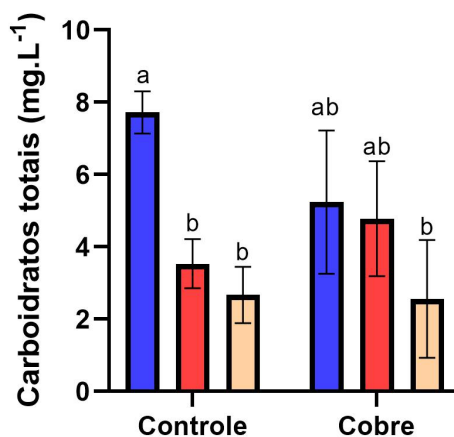


Figura 14. Concentrações de carboidratos totais. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

De acordo com os resultados da análise estatística observamos que a concentração de carboidratos não sofreu variação significativa, entretanto observamos aqui um erro bastante elevado na determinação dessa molécula nos tratamentos com o cobre. Nesse caso, o coeficiente de variação foi maior do que 50%. Apesar disso, pensamos que pode ser possível que na luz azul e situação controle tenha havido estímulo de carboidratos.

É relevante comparar estes resultados com os da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* no trabalho de Oliveira (2023). Ao ser cultivada sobre concentração de cobre de 1.10^{-8} M, houve aumento significativo de carboidratos totais em comparação com a menor concentração de cobre utilizada, de $1,3.10^{-10}$ M (Oliveira, 2023). Neste estudo, a

microalga *Pediastrum* sp. foi cultivada sob concentração de cobre superior, de $7,5 \cdot 10^{-7}$ M, mas o aumento significativo na concentração de carboidratos não foi verificado. Exemplos da literatura reafirmam o caráter espécie-específico da resposta de biomoléculas a agentes tóxicos (Magdaleno, 2014; Levy et al, 2008), portanto, com tolerância variada à metais a depender da espécie e cepa utilizada. Simultaneamente, condições de luminosidade e nutrientes do cultivo podem causar alterações na composição bioquímica da célula (Jaiswal et al., 2020).

A concentração de carboidratos totais pode ser indicativo do efeito de variáveis experimentais no metabolismo algal como luz, metais dentre outros (Baracho, Silva e Lombardi 2019; Masojidek, Torzillo e Koblízek, 2013). De acordo Masojidek, Torzillo e Koblízek (2013) “a fotossíntese pode ser definida como uma reação de oxirredução movida pela luz em que o dióxido de carbono (CO_2) é convertido em carboidratos”. Portanto, o efeito de fatores ambientais deve estar relacionado com um equilíbrio entre a produção direta dessa biomolécula e seu uso pela célula.

4.4.2. Proteínas

O alto erro para proteínas totais determinadas na biomassa de *Pediastrum* sp. (Figura 15) sugere que pode ter havido problemas quanto ao rompimento da parede celular, durante sua determinação.

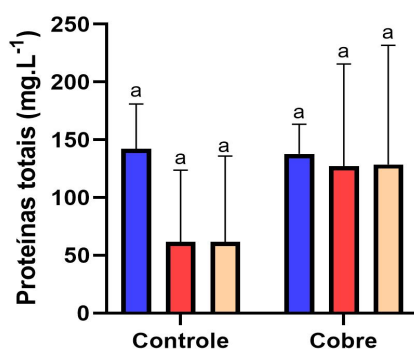


Figura 15. Concentrações de proteínas. Controle: Cu usual do meio BG11 e Cobre EC20, para todas as cores de luz LED. Os valores representam a média (n=3) e as barras de erro, o desvio padrão da média. A barra azul corresponde ao cultivo com LED azul, a barra

vermelha ao cultivo com LED vermelho e a barra amarela corresponde ao cultivo com LED branco. Letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Os resultados de proteínas totais nesta pesquisa não apresentaram significância estatística. Entretanto, de acordo com a literatura, poderia ser esperado um aumento dessa biomolécula a partir da exposição à concentração mais elevada do cobre em comparação com o controle, como observado na microalga *Scenedesmus vacuolatus* (Sabatini et al., 2009). Isso estaria, segundo relatado na literatura, com a formação de proteínas ligantes de metal para mitigar seus efeitos intracelulares.

As condições experimentais para outra espécie de Chlorophyta dulciaquícola, *Kirchneriella contorta*, com cultivo com concentração de cobre inferior ao EC20 em Aoyagi (2020), demonstraram aumento de até 30% de proteínas. De acordo com o autor, o efeito de magnificação deu-se na combinação cobre com luz azul. Junto ao aumento da concentração de proteínas o autor mostrou que houve acréscimo de 50% de carotenoides totais, que em *Pediastrum* sp. mantiveram-se constantes.

5. Conclusão

Diferentes cores de luz LED, na presença ou ausência de cobre subletal (EC20) causaram alterações na resposta fisiológica de *Pediastrum* sp., com particularidades entre os parâmetros analisados. A luz azul favoreceu o acúmulo de clorofilas *a* e *b* em associação com o cobre subletal, já para a situação controle os carotenoides e carboidratos totais foram estimulados nessa mesma condição de luminosidade.

O cobre na concentração equivalente ao EC20 intensificou a dissipação fotoquímica independente da cor de luz à qual as culturas foram expostas, mas a dissipação não-fotoquímica em associação com o metal foi maior apenas sob luz branca e vermelha.

Devido às características do processo fotossintético, foi levantada a hipótese do cobre ter influenciado na cadeia de transporte de elétrons por meio de sua associação com a plastocianina, enquanto as cores de luz LED influenciam na biossíntese de clorofilas.

Entretanto, os resultados mostraram que tais interagiram simultaneamente e de modo diferente para cada tratamento a qual a *Pediastrum* sp. foi submetida.

6. Referências Bibliográficas

ABELIOVICH, Aharon et al. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. 2 Ed. Black Science Ltd, 2006.

AGREGÁN, R. et al. Antioxidant potential of extracts obtained from macro- (Ascophyllum nodosum, Fucus vesiculosus and Bifurcaria bifurcata) and micro-algae (Chlorella vulgaris and Spirulina platensis) assisted by ultrasound. Medicines, v. 5, n. 2, p. 33, 2018.

ALLBALASMEH A., Berhe, A. A. & Ghezzehei, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydrate Polymers. v. 97 p. 253–261, 2013

AMARO, H. M. *et al.* Light-emitting diodes – a plus on microalgae biomass and high-value metabolite production. Journal of Applied Phycology, v. 32, p. 3605-3618; 2020.

AZIMONTI et al. Comparison of NOEC values to EC10/EC20 values, including confidence intervals, in aquatic and terrestrial ecotoxicological risk assessment. European Food Safety Authority. ISSN:2397-8325. 2015.

BARACHO, D. H.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. Journal of phycology, v. 55, n. 6, p. 1335–1347, 2019.

BARBER, P. H. Advancing biodiversity research in developing countries: the need for changing paradigms. Bulletin of Marine Science, v. 90, nº1, p. 187-210, 2014

BJÖRN, L. O. *et al.* A viewpoint: Why chlorophyll a? Photosynth res, v.99, p. 85-98, 2009.

CAMARGO, E. C. Estudo da fisiologia do crescimento, produção de biomoléculas e fotossíntese de 30 espécies de microalgas verdes de água doce. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 124 p.. 2020.

CAVALLETTI, E. et al. Copper Effect on Microalgae: Toxicity and Bioremediation Strategies. *Toxics*, v. 10, n.9. 2022.

CHIA, M. A. et al. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aquatic Toxicology*, v. 160, p. 87–95, 2015.

CHIA, M. A.; GALADIMA, S. Y.; JAPHET, W. S. Combined effect of atrazine and copper on the growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus quadricauda*. *Phycologia*, v. 54, n. 2, p. 109–117, 2015.

CHISTI, Y. Microalgae in Health and Disease Prevention .Society and Microalgae, Elsevier,. In I. A. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Elsevier. p.11–211. 2018.

CÔRREA DA SILVA, M. G. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of *Pediastrum boryanum* (Chlorococcales) biomass. *International Journal of Environmental Health Research*, v. 32, n.1, 2022.

DÁVILA, C.; TORANZOS, G. A.; Effect of a nutrient availability on lipid productivity of *Botryococcus* sp. (Botryococcaceae, Chlorophyta), a newly isolated tropical microalgae strain from Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, v. 53, p. 60-73, 2020.

ECHEVESTE, P.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a 775 cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 776 143, p. 228–235, 2017.

EJIKE, C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science & Technology*, v. 59, p. 30-36, 2016.

FELLAHI, A. E. et al. Monitoring of Microalgae Lipid Accumulation using RF Open Ended Biosensor. *IEEE Sensors Letters*. V.2, n. 3, p. 1472-1475, 2017.

FORZZA, Rafaela Campostrini et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 1. P. 49-61; 340. JBRJ, 2010.

GODINHO, L. R.; COMAS GONZALEZ, A. A.; BICUDO, C. E. de M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). Hoehnea, São Paulo. v. 37, n. 3, p. 513-553, 2010

GUIRY, M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2012. Disponível em: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43414. Acesso em 27 de Julho de 2023.

HUANG, X.; HUANG, C.; XU, Y. Body size of fóssil *Pediastrum* in lake sediments as an indicator of temperature variation. [Palaeoclimatology, Palaeoecology, v.625](#). 2023

JAISWAL, Krishna Kumar et al. Ecological stress stimulus to improve microalgae biofuel generation: a review. Octa J Biosci, v. 8, p. 48-54, 2020.

LARKUM, A. W.D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. Photosynthesis in Algae. Advances in Photosynthesis and Respiration; Capítulos 2, 7, 10, 12, 13 e 15. v.14. ISBN 0-7923-6333-7 2003.

LAVENS, P.; SOORGELOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361, p. 31-40. 1996.

LEVY, J. L.; ANGEL, B. M. et al. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. Aquatic toxicology, v. 89, n.2, p. 82-93. 2008.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e Aplicações. ISBN 8576561131. São Carlos: Editora RiMa, 2006

MAGDALENO, A. et al. Effects of cadmium, copper and zinc on growth of four isolated algae from a highly polluted Argentina river. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 92, n. 2, p. 202-207, 2014.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D.. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion

technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, p. 631-645, 2012

MASOJIDEK, J. TORZILLO, G.; KOBLÍZEK, M. Handbook of microalgal culture. Capítulo 2, 17 p. *Applied Biotechnology and Phycology*. 2013.

MIAZEK, K. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth 840 and industrial product biosynthesis: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 841 16, n. 10, p. 23929–23969, 2015.

MOLINA, F.P. H. Identificación de regiones isofuncionales en el citocromo c6 y en la plastocianina. Tese de Doutorado, Universidad de Sevilla, Sevilla. 2001.

MONOD, J. The Growth of Bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, v.3, p. 371-394, 1949.

OLIVEIRA, R. V. Concentrações ambientais de cobre induzem ao acúmulo de biomoléculas em *Ankistrodesmus fusiformis*. Universidade Federal de São Carlos, 34p., 2023

PRATES, D. DA F. et al. Role of light emitting diode (LED) wavelengths on increase of protein productivity and free amino acid profile of *Spirulina* sp. cultures. *Bioresource Technology*, v. 306, n. December 2019, p. 123184, 2020.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and Industrial applications of microalgae – An overview. *Journal of algal biomass utilization*, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012

RAIVANSHI, M. et al. Biomolecules from Microalgae for commercial applications. Sustainable downstream processing of microalgae for industrial application. CRC Press (Taylor and Francis Group), p.3-38, 2019.

RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*, v. 78, p. 237–251, 1981.

SABATINI, S. E. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 72, n. 4, p. 1200-1206, 2009.

SATTHONG, S. *et al.* Modeling the effects of light sources on the growth of microalgae. *Advances in Difference equations*. Artigo 170, 20119.

SCHULZE, P. S., *et. al.* Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Research*, v. 16, p. 387-398, 2016.

SHOAF, W. T. & LIUM, B. W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*, v. 21, p. 1973–1975, 1976.

SILVA, C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacity of *Pediastrum boryanum* (Chlorococcales) biomass. *International Journal of Environmental Health Research*, n. 32, v.1, p. 168–180, 2022.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, 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.

SLOCOMBE, S. P. *et al.* A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 51–57, 2013.

SOUZA, D. B. S.; 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.

TEO, C. L. *et al.* Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource Technology*, v. 162, p. 38–44, 2014.

TIPPAWAN, P.; YUWADEE, P. Isolation and cultivation of green alga, *Pediastrum* spp. for nutritional value study. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, n. 10, v.3, p. 1787–1796. 2016.

XU, Y.; HARVEY, P.J. Carotenoid Production by *Dunaliella salina* under Red Light. *Antioxidants*, 2019.

ZHU, L. Microalgal culture strategies for biofuel production: A review. *Biofuels, Bioproducts and 922 Biorefining*, v. 9, n. 6, p. 801–814, 2015.

ZHU, X.; ZHAO, W.; CHEN, X. *et al.*. Growth inhibition of the microalgae *Skeletonema costatum* under copper nanoparticles with microplastic exposure. *Marine Environmental Research*, v. 158. 2020.

