

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**DOUGLAS HENRIQUE BARACHO DA SILVA**

**CONCENTRAÇÕES DE COBRE AMBIENTALMENTE RELEVANTES AFETAM**  
**A FISIOLOGIA EM *CHLOROLOBION BRAUNII***

São Carlos-SP  
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

DOUGLAS HENRIQUE BARACHO DA SILVA

CONCENTRAÇÕES DE COBRE AMBIENTALMENTE RELEVANTES AFETAM  
A FISIOLOGIA EM *CHLOROLOBION BRAUNII*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa Dra Ana Teresa Lombardi

São Carlos-SP

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Douglas Henrique Baracho da Silva, realizada em 05/11/2018:

*Ana Lombardi*

---

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

*Patricia Mayrink*

---

Profa. Dra. Patricia Franklin Mayrink Nogueira  
UNESP

*Suzelei Rodigher*

---

Profa. Dra. Suzelei Rodigher  
UNESP

*Dedico esta pesquisa a minha mãe  
pelo seu amor incondicional.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por me dar saúde e forças para lutar pelos meus sonhos.

À minha mãe por todo apoio ao longo da jornada e pelas palavras de incentivo quando eu precisei.

À professora Ana Teresa Lombardi pela paciência e dedicação ao longo de todo o trabalho. Orientadores iguais a ela são raros.

Aos amigos do laboratório por toda a ajuda e por serem pessoas especiais.

À Jaqueline, por estar presente em todas as etapas da minha vida desde o momento que nossos caminhos se cruzaram.

Aos amigos que fiz na graduação (Andreza, Ariane, Beatriz, Bruninho, Fábio, Ingrid, Julia, Mariana, Neda, Nilmara, Renata, Shade e tantos outros) e que levarei para a vida toda.

Aos amigos da vida. Muito obrigado pelos momentos em que precisei me distanciar da vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
INTRODUÇÃO .....	14
OBJETIVOS: .....	18
<i>Objetivos gerais</i> .....	18
<i>Objetivos específicos</i> .....	18
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
a) <i>Culturas de microalgas</i> .....	19
b) <i>Íons de cobre livre (Cu<sup>2+</sup>)</i> .....	20
c) <i>Parâmetros de crescimento</i> .....	21
d) <i>Parâmetros fotossintéticos</i> .....	22
e) <i>Composição bioquímica</i> .....	23
f) <i>Análise estatística</i> .....	24
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS .....	43

## RESUMO

O cobre desempenha um papel vital no metabolismo das microalgas, mas o que sabemos sobre ele é largamente baseado em estudos conduzidos com altas concentrações de cobre, e muito menos é conhecido quando concentrações de cobre ambientalmente relevantes na fisiologia das microalgas são questionadas. Aqui, nós avaliamos a fisiologia de *Chlorolobion braunii* exposta a concentrações de íons de cobre livre entre  $5,7 \times 10^{-9}$  a  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, incluindo valores ambientalmente relevantes. O crescimento populacional e os parâmetros fotossintéticos foram determinados em experimentos de laboratório controlados por 96 horas. Células em crescimento exponencial (culturas de 48 h) foram analisadas quanto ao rendimento quântico efetivo e curvas rápidas de luz (RLC), bem como lipídios totais, proteínas e carboidratos, clorofila *a* e concentrações de carotenóides. Os resultados mostraram que as taxas de crescimento e a densidade populacional diminuíram gradualmente com o aumento do cobre nas culturas, com a concentração de clorofila *a* sendo afetada de forma menos intensa do que os parâmetros de crescimento. Até  $4,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre nenhum efeito foi obtido para rendimentos quânticos máximo e efetivo e *quenching* fotoquímico (qP). No entanto, a  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> eles foram drasticamente reduzidos e o *quenching* não fotoquímico (NPQ) aumentou. Curvas rápidas de luz e seus parâmetros ( $E_k$ ,  $\alpha$  e ETRmax) foram inversamente correlacionados com as concentrações de cobre livre. O rendimento de biomoléculas aumentou sob concentrações de cobre ambientalmente relevantes, situação em que os valores absolutos não foram afetados. Duas importantes aplicações podem ser delineadas a partir da presente pesquisa, uma relacionada à ecologia e outra à biotecnologia. Como a concentração de cobre no ambiente está aumentando gradualmente devido às atividades antrópicas, as investigações que usam valores ambientalmente relevantes são de interesse tanto para a ecologia quanto para a fisiologia da microalga, e mais próximas da realidade do que as investigações toxicológicas agudas.

Palavras-chave: microalgas, biomoléculas, curvas rápidas de luz, PhytoPAM

## ABSTRACT

Copper plays vital role in microalgae metabolism, but what we know about it is largely based in studies conducted with high copper concentrations, much less is known when environmentally relevant copper concentrations in microalgae physiology comes into question. Here, we evaluated the physiology of *Chlorolobion braunii* exposed to free copper ions concentrations between  $5.7 \times 10^{-9}$  to  $5.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, thus including environmentally relevant values. Population growth and photosynthetic parameters were determined in 96 h controlled laboratory experiments. Exponentially growing cells (48 h cultures) were analyzed for effective quantum yield and rapid light curves (RLC), as well as total lipids, proteins and carbohydrates, chlorophyll *a* and carotenoids concentrations. Results showed that growth rates and population density decreased gradually as copper increased in cultures, with chlorophyll *a* concentration been affected less intensively than the growth parameters. Up to  $4.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> free copper no effect was obtained for maximum and effective quantum yields, and photochemical quenching (qP). However, at  $5.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> they were drastically reduced and non-photochemical quenching (NPQ) increased. Rapid light curves and their parameters ( $E_k$ ,  $\alpha$  and ETR<sub>max</sub>) were inversely correlated with free copper concentrations. The yield of biomolecules increased under environmentally relevant copper concentrations, situation where the absolute values were not affected. Two important applications can be delineated from the present research, one related to ecology and the other one to biotechnology. Because copper concentration in the environment is gradually increasing due to anthropic activities, investigations that use environmentally relevant values are of interest to both ecology and microalgae physiology, and closer to reality than acute toxicological investigations.

Keywords: microalgae, biomolecules, rapid light curves, PhytoPAM

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Curva de calibração para o sistema ISE de cobre, reportada como leituras potenciais (mV) em função do Log [Cu<sup>2+</sup>] (mol L<sup>-1</sup>). Equação da reta  $y = 30x + 268$ ,  $r^2 = 0.9997$ .

**Figura 2.** Parâmetros de crescimento obtidos durante 96 h para culturas de *C. braunii*. Densidade populacional (Ln [células mL<sup>-1</sup>]) em função do tempo experimental (a); densidade populacional em 48 h (b); clorofila *a* (µg mL<sup>-1</sup>) em 48 h (c); taxas de crescimento (d<sup>-1</sup>) (d) em função da concentração de log Cu<sup>2+</sup> livre (mol L<sup>-1</sup>). Os símbolos aplicam-se a concentrações de cobre livre (mol L<sup>-1</sup>): círculo aberto 5.7x10<sup>-9</sup>, ampulheta fechada 2.5x10<sup>-8</sup>, diamante aberto 1.1x10<sup>-7</sup>, diamante fechado 1.5x10<sup>-7</sup>, triângulo aberto 4.7x10<sup>-7</sup>, triângulo fechado 2.7 x10<sup>-6</sup>, quadrado aberto 4x10<sup>-6</sup>, quadrado fechado 5x10<sup>-6</sup>. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

**Figura 3.** Rendimento quântico máximo (Φ<sub>M</sub>) do PSII relatado em unidades de fluorescência relativa (R.U.) em função do tempo experimental em culturas de *C. braunii*. Os símbolos aplicam-se a concentrações de cobre livre (mol L<sup>-1</sup>): círculo aberto 5.7x10<sup>-9</sup>, ampulheta fechada 2.5x10<sup>-8</sup>, diamante aberto 1.1x10<sup>-7</sup>, diamante fechado 1.5x10<sup>-7</sup>, triângulo aberto 4.7x10<sup>-7</sup>, triângulo fechado 2.7 x10<sup>-6</sup>, quadrado aberto 4x10<sup>-6</sup>, quadrado fechado 5x10<sup>-6</sup>. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

**Figura 4.** Parâmetros de fluorescência do PSII em 48 h em função da concentração de cobre livre. Rendimento quântico (a) e quenchings (b). Símbolos da barra: cinza, rendimento quântico máximo; tracejada, rendimento quântico efetivo; branco, quenching fotoquímico; preto, quenching não fotoquímico dissipado na forma de calor (NPQ). Estatística: letras iguais acima das barras não indica diferença significativa (ANOVA p > 0,05).

**Figura 5.** Curvas rápidas de luz (RLC) em 48 h de exposição de cobre representada como taxa relativa de transporte de elétrons (ETR, µmol elétrons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR, µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os símbolos aplicam-se a concentrações de cobre livre (mol L<sup>-1</sup>): círculo aberto 5.7x10<sup>-9</sup>, ampulheta fechada 2.5x10<sup>-8</sup>, diamante aberto 1.1x10<sup>-7</sup>, diamante fechado 1.5x10<sup>-7</sup>, triângulo aberto 4.7x10<sup>-7</sup>, triângulo fechado 2.7 x10<sup>-6</sup>, quadrado aberto 4x10<sup>-6</sup>, quadrado fechado 5x10<sup>-6</sup>. As linhas

representam o melhor ajuste dos dados de acordo com Platt et al. (1980). Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

**Figura 6.** Parâmetros relacionados com a fotossíntese obtidos após o ajuste de RLC de acordo com Platt et al. (1980) relatado em função do log da concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Em 7a ( $\alpha$ ), 7b ( $E_k$ ) e 7c ( $r\text{ETR}_{\text{max}}$ ). Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

**Figura 7.** Biomoléculas totais em 48h para culturas de *C. braunii* em função das concentrações de cobre testadas representadas como proteínas (barras tracejadas), carboidratos (barras brancas), lipídios (barras pretas). Em (a) valores absolutos de biomoléculas ( $\text{pg célula}^{-1}$ ; os valores de carboidratos foram multiplicados por 3 e lipídios por 10), e em (b) rendimento de biomoléculas ( $\text{pg célula}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

**Figura 8.** Pigmentos totais em *C. braunii* em culturas de 48 h para as concentrações de cobre testadas representadas como clorofila *a* (barras tracejadas) e carotenóides (barras pretas). Em (a) valores absolutos de biomoléculas ( $\text{pg.cell}^{-1}$ ) e em (b) rendimento de biomoléculas ( $\text{pg célula}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Concentrações de cobre adicionado ao meio de cultura BG11 24 h antes da inoculação das células (cobre nominal) e íons de cobre livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ) determinadas por ISE.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  Eficiência fotossintética

$\mu$  Taxa específica de crescimento

% Porcentagem

~ Aproximadamente

°C Graus Celsius

Cd Cadmio

Chl *a* Clorofila *a*

CO<sub>2</sub> Dióxido de carbono

Cu Cobre

Fe Ferro

Fm' Fluorescência máxima em adaptação à luz

F0' Fluorescência mínima em adaptação à luz

Fm Fluorescência máxima em adaptação ao escuro

Fo Fluorescência mínima em adaptação ao escuro

Fs Fluorescência em estado estável de transporte de elétrons

h Hora

L Litro

Log Logaritmo base 10

m Metro

Mg Magnésio

min Minuto

mL Mililitro

NPQ Quenching não fotoquímico

PAR Radiação fotossinteticamente ativa

pg Picograma

PSI Fotossistema I

PSII Fotossistema II

QA Plastoquinona A

qP Quenching fotoquímico

R.L.C. curva rápida de saturação de luz

R.U. Unidades relativas

R.F.U Unidades de fluorescência relativa

rETRmax Taxa de transporte de elétrons máxima

ROS Espécies reativas de oxigênio

Zn Zinco

$\Phi'_M$  Rendimento quântico operacional

$\Phi_M$  Rendimento quântico máximo

## 1 INTRODUÇÃO

2

3 O cobre alcança ambientes aquáticos por processos naturais ou artificiais, como o  
4 desgaste do solo e descargas industriais (NRIAGU, 1990), bem como através do seu uso  
5 como algicida (BISHOP et al., 2018; GIBSON, 1972). Como todos os outros metais, o  
6 cobre não é degradável, portanto, tende a se acumular nos corpos de água, resultando no  
7 aumento gradual de suas concentrações (ISMAIEL; SAID, 2018).

8 O cobre é um micronutriente essencial necessário para vários processos  
9 fisiológicos em microalgas, e deve ser mantido dentro de uma faixa estreita com o risco  
10 de toxicidade em níveis acima do necessário (DEWEZ et al., 2005; ECHEVESTE;  
11 SILVA; LOMBARDI, 2017; LOMBARDI; MALDONADO, 2011; SUNDA;  
12 HUNTSMAN, 1998). Segundo BOSSUYT e JANSSEN (2004), as microalgas  
13 desenvolveram mecanismos para lidar com os efeitos duais do cobre. Estes podem  
14 envolver ATPases do tipo P funcionando para bombear cobre para fora das células através  
15 de membranas biológicas; LOMBARDI et al (2000) e LOMBARDI, VIEIRA e  
16 SARTORI (2002) mostraram que compostos extracelulares produzidos por microalgas  
17 podem reduzir a biodisponibilidade do cobre no ambiente circundante; As chaperonas de  
18 cobre intracelulares demonstraram estar ativas quando o excesso de cobre está presente  
19 (CID et al., 2010; JAMERS et al., 2006).

20 A essencialidade do cobre depende de suas múltiplas funções, compreendendo  
21 diversas vias metabólicas, como no transporte de elétrons da cadeia fotossintética  
22 respiratória, onde está associado a proteínas transportadoras (RAVEN; EVANS; KORB,  
23 1999), em certos sistemas de transporte de Fe de alta afinidade (MALDONADO et al.,  
24 2006; PEERS; PRICE, 2006), entre outros. A pesquisa até hoje estabeleceu que o  
25 aumento do cobre no meio de cultura de microalgas leva ao desequilíbrio desse metal  
26 dentro das células, com deterioração geral do funcionamento metabólico (CID et al.,  
27 2010; SUNDA; HUNTSMAN, 1998). Isto leva a diminuir o conteúdo de pigmentos e  
28 induzir a peroxidação lipídica (BOSSUYT; JANSSEN, 2004), culminando na diminuição  
29 da capacidade de divisão das microalgas, resultando em menores taxas de crescimento e  
30 declínio geral da população em comparação com as concentrações de cobre usadas, por  
31 exemplo, as ambientalmente relevantes (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). O que  
32 ainda não está claro, entretanto, é se baixas concentrações de cobre, por exemplo,  $\sim 10^{-9}$

33 -  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, afetarão a fisiologia das microalgas de forma que elas possam se propagar  
34 através das cadeias alimentares, mudando, por exemplo, a composição de biomoléculas.  
35 A tese central desta dissertação é que o aumento gradual do cobre no ambiente pode levar  
36 a mudanças fisiológicas importantes para o meio ambiente em microalgas.

37 Microalgas podem ser consideradas como protistas fotossintetizantes, vivendo  
38 isoladas ou em colônias, unicelulares ou filamentosas (VAN DEN HOEK; MANN;  
39 JAHNS, 1995). Elas podem ser usadas como indicadores de qualidade de corpos d'água  
40 e como organismos modelo em estudos de toxicidade (GEORGOPOULOS et al., 2001),  
41 já que se encontram presentes em quase todos os ambientes e habitats da Terra e por  
42 responderem rápido a uma ampla gama de contaminantes. O entendimento dos efeitos de  
43 metais-traço como o cobre em microalgas é importante pois elas servem como recurso  
44 alimentar em níveis superiores da teia trófica em ecossistemas aquáticos, atuando no  
45 balanço energético. Além disso, microalgas participam da ciclagem de carbono pelo  
46 processo de fotossíntese, onde pela assimilação de carbono inorgânico, luz e água,  
47 produzem matéria orgânica que suporta os ecossistemas aquáticos e libera O<sub>2</sub>  
48 (REYNOLDS, 2006).

49 Recentemente, pesquisadores examinaram os efeitos do cobre (em baixas  
50 concentrações de íons Cu<sup>2+</sup> livre) em microalgas e mostraram que estes, de fato, podem  
51 causar algum efeito na fisiologia das algas. ECHEVESTE, SILVA e LOMBARDI (2017)  
52 investigaram os efeitos do cobre em *Chlorolobium braunii*, a mesma espécie que usamos,  
53 e obtiveram um comprometimento do crescimento populacional em  $2,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de  
54 cobre total (equivalente a  $\sim 1,1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> livre no meio de cultura usado);  
55 SILVA, ECHEVESTE e LOMBARDI (2018) estudaram os efeitos do mesmo metal em  
56 outra microalga de água doce, *Scenedesmus quadricauda*, e mostraram que o crescimento  
57 populacional e o teor de clorofila *a* diminuíram em  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre total ( $\sim$   
58  $5 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> no meio de cultura usado), e o rendimento quântico fotossintético  
59 declinou  $\sim 31\%$  em células expostas a  $2,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> ( $\sim 1,1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> livre)  
60 e acima. LOMBARDI e MALDONADO (2011) mostraram que em  $3,1 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> de  
61 Cu<sup>2+</sup>, o crescimento e a fotossíntese foram prejudicados em *Phaeocystis cordata*, uma  
62 Haptophyta oceânica. Segundo RALPH et al., (2007), o dano ao aparato fotossintético  
63 reduz o crescimento da população de microalgas, e o estresse na fotossíntese leva a uma  
64 diminuição na responsividade das microalgas às adversidades.

65 As microalgas apresentam plasticidade fisiológica e podem responder a situações  
66 de estresse de metal através da alteração na composição de suas biomoléculas, como  
67 pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídios (CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013;  
68 CONTRERAS; MOENNE; CORREA, 2005; ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI,  
69 2017; MIAZEK et al., 2015; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018). Além disso,  
70 alguns autores (CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013; ECHEVESTE; SILVA;  
71 LOMBARDI, 2017; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018) propõem que essas  
72 moléculas podem ajudar as células a lidar com o estresse induzido por metal. Sabe-se que  
73 o estresse oxidativo gerado por metais traços, como o cobre, pode promover mudanças  
74 bioquímicas na biomassa de algas (GARBAYO et al., 2012). Assim, pode-se argumentar  
75 que uma situação capaz de desencadear a síntese e o acúmulo de biomoléculas pode ser  
76 usada como agente manipulador para a produção de biomoléculas de microalgas de  
77 interesse. Além disso, se esta situação é tal que a taxa de crescimento não é grandemente  
78 prejudicada, um ganho líquido em biomolécula pode ser alcançado aumentando assim o  
79 rendimento da biomolécula. De fato, a estimulação de moléculas alvo em microalgas por  
80 metais tem mostrado ser dependente da combinação do tipo de metal e suas  
81 concentrações, bem como da espécie de microalga (CHIA; GALADIMA; JAPHET,  
82 2015a; CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013; MIAZEK et al., 2015). Assim, a  
83 composição de microalgas considerando lipídios (LOMBARDI; WANGERSKY, 1991;  
84 QIAN et al., 2012), proteínas (CONTRERAS; MOENNE; CORREA, 2005; FÁBREGAS  
85 et al., 1989; QIAN et al., 2012), carboidratos (CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013) e  
86 outros biomoléculas específicas (RODRIGUES et al., 2014) podem ser manipuladas para  
87 alta ou baixa produção. Existe atualmente um interesse na produção de biomoléculas de  
88 microalgas (SANKARAN et al., 2018), uma vez que estas podem ser cultivadas em locais  
89 que não competem com a produção de alimentos humanos.

90 Duas importantes aplicações podem ser previstas no presente estudo, uma  
91 relacionada à ecologia e outra à fisiologia/biotecnologia. Investigações que utilizam  
92 valores ambientalmente relevantes estão mais próximas da realidade do que investigações  
93 toxicológicas agudas, portanto mais relacionadas a ecossistemas naturais. Em relação à  
94 fisiologia/biotecnologia, devido à plasticidade fisiológica das microalgas, a exposição a  
95 quantidades vestigiais de metais pode induzir a síntese de biomoléculas e se essas  
96 concentrações não forem suficientes para diminuir a taxa de crescimento, um ganho no  
97 rendimento das biomoléculas pode ser obtido.

98           Este estudo examina algumas respostas fisiológicas de *Chlorolobium braunii*,  
99   uma Chlorophyta cosmopolita de água doce, exposta a uma ampla gama de íons de cobre  
100 livre ( $5,7 \times 10^{-9}$  a  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). Seu crescimento, fotossíntese e produção de  
101 biomoléculas foram investigados. Nosso objetivo foi entender a fisiologia da microalga  
102 ao mesmo tempo em que procuramos por uma concentração de cobre que fosse capaz de  
103 desencadear a produção de biomoléculas.

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122 OBJETIVOS

123

124 Objetivos gerais

125

126 Nosso objetivo foi investigar sobre os efeitos do íon de cobre em concentrações  
127 ambientalmente relevantes e acima dessas na fisiologia e composição de biomoléculas da  
128 microalga Chlorophyta de água-doce *Chlorolobion braunii*.

129

130 Objetivos específicos

131

- 132 · Examinar respostas fisiológicas como o crescimento, concentração de clorofila *a*  
133 e densidade populacional em culturas de *C. braunii* em função das concentrações  
134 de cobre;
- 135 · Examinar o efeito do cobre na resposta fotossintética da microalga usando a  
136 fluorometria PAM.
- 137 · Determinar a composição de biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos,  
138 clorofila *a* e carotenóides) de *C. braunii* nas várias concentrações de Cu testadas;

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

## 153 MATERIAL E MÉTODOS

154

### 155 a) Culturas de microalgas

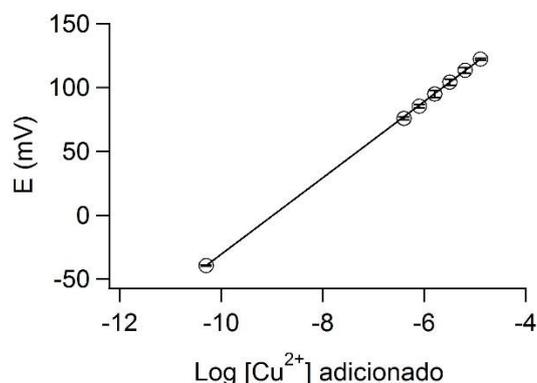
156 Os experimentos foram conduzidos com a microalga verde de água doce  
157 *Chlorolobion braunii* obtida da coleção de microalgas de água doce (registrado no World  
158 Data Center for Microorganisms, número 835) do Departamento de Botânica da  
159 Universidade Federal de São Carlos. Culturas em lote em meio BG11 (RIPPKA et al.  
160 1979) foram utilizadas e mantidas sob condições ambientais controladas (temperatura  
161  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo 12 h claro: 12 h escuro e intensidade da luz incidente  $130 \mu\text{mol}$   
162  $\text{fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). O meio BG11 utilizado no experimento foi feito inicialmente sem a adição  
163 do cobre na sua composição, esterilizado através de autoclave (20 min, 121°C, 1 bar; AV  
164 Phoenix Lufenco, Brasil) e 24 horas antes do início do experimento o cobre oriundo de  
165 uma solução padrão de cobre (AAS/ICP, 1000 mg L<sup>-1</sup>, 38996 Sigma-Aldrich, EUA) foi  
166 adicionado. Cada tratamento foi realizado em frascos de tecido de poliestireno com  
167 capacidade de 1 L com 800 mL de cultura constante, arranjado verticalmente e  
168 borbilhado com ar filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ; Chromafil Xtra PUDF 20/25, Alemanha). Células  
169 em crescimento exponencial foram inoculadas com densidade celular inicial  $10^4$  células  
170 mL<sup>-1</sup> em sete concentrações nominais de cobre que incluíam valores ambientalmente  
171 relevantes ( $10^{-7}$ , controle,  $3.2 \times 10^{-7}$ ,  $5.0 \times 10^{-7}$ ,  $1.8 \times 10^{-6}$ ,  $3.2 \times 10^{-6}$ ,  $5.1 \times 10^{-6}$ ,  $8.2 \times 10^{-6}$ ,  
172  $2.2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). O experimento durou 96 horas; as manipulações da cultura foram  
173 realizadas em um gabinete de fluxo laminar (Veco, modelo VLFS 12, Brasil) garantindo  
174 ambiente filtrado e livre de partículas.

175 Para assegurar condições estáveis de crescimento nas culturas em batelada, a  
176 densidade celular máxima de *C. braunii* foi de  $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>. Deve-se estar atento  
177 aos experimentos realizados em culturas de lotes, uma vez que suas condições internas  
178 podem ser altamente variáveis, e é difícil isolar o fator de interesse. LOMBARDI e  
179 MALDONADO (2011) discutiram sobre a vulnerabilidade de sistemas em batelada em  
180 estudos fisiológicos de microalgas e mostraram que culturas em bateladas de até 48 h (~  
181  $2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> *Phaeocystis cordata*) se comparam com culturas semi-contínuas,  
182 sustentando as condições de crescimento. Por esse motivo, realizamos nossas medições  
183 fisiológicas em 48 horas.

184 b) Íons de cobre livre ( $\text{Cu}^{2+}$ )

185 Íons de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) foram determinados no meio de cultura 24h após sua adição,  
186 seguindo a metodologia descrita em Lombardi et al. (2007), imediatamente antes do início  
187 do experimento. A metodologia é baseada em um eletrodo seletivo de íons de cobre (ISE-  
188 Cu) com calibração de tampão de íons metálicos. Usamos um eletrodo seletivo de cobre  
189 (ISE-Cu) como eletrodo de trabalho (Thermo Scientific Orion 9429BN), um eletrodo de  
190 referência de junção dupla (Thermo Scientific Orion 900200, fluxo seguro D / J) sob  
191 temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C. O tampão de íon metálico foi composto por borato  
192 de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha), nitrato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha),  
193 padrão de cobre (38996 Sigma-Aldrich, EUA) e ácido nitrilotriacético (Sigma-Aldrich,  
194 Alemanha) que ficou em contato com o eletrodo por ~ 6 a 8 horas. Isso estendeu os limites  
195 de detecção do sistema ISE-Cu para  $10^{-10}$  mol  $\text{L}^{-1}$ . A curva de calibração para o sistema  
196 ISE-Cu realizada em pH 5 é mostrada na figura 1. Foi realizada a partir da diluição parcial  
197 de um padrão comercial mono-elemento AAS / ICP de cobre ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) (38996  
198 Sigma-Aldrich, EUA).

199



200

201 **Figura 1.** Curva de calibração para o sistema ISE de cobre, reportada como leituras  
202 potenciais (mV) em função do Log [ $\text{Cu}^{2+}$ ] ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Equação da reta  $y = 30x + 268$ ,  $r^2 =$   
203  $0.9997$ .

204

205 Os tempos de equilíbrio para a determinação de cobre livre variaram de acordo  
206 com a resposta do eletrodo e a concentração da solução. Enquanto acima de  $2.7 \times 10^{-6}$  mol  
207  $\text{L}^{-1}$  de cobre livre exigiu um tempo de estabilização de ~ 1: 30 h, abaixo dele ~ 3 a 4 horas

208 foram necessários. As medições foram realizadas em sala limpa e a técnica de limpeza de  
 209 metal traço foi utilizada por toda a sala. A Tabela 1 mostra as concentrações nominais de  
 210 cobre e seus respectivos íons livres de cobre determinados. O meio BG-11 contém o  
 211 agente complexante de metal sintético EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) que muito  
 212 contribuiu para a diferença entre cobre nominal e o cobre livre. Como as microalgas  
 213 respondem ao cobre disponível que está intimamente relacionado aos íons livres de  
 214  $\text{Cu}^{2+}$ , nós baseamos nossos resultados e discussões nas concentrações de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e não  
 215 em valores totais ou nominais.

216

217 Tabela 1. Cobre adicionado ao meio de cultura BG11 24 horas  
 218 antes da inoculação das células (cobre nominal) e concentrações de  
 219 íons de cobre livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ) determinadas por ISE-Cu.

Cobre nominal	Cobre livre
$1.0 \times 10^{-7}$	$5.7 \times 10^{-9}$
$3.2 \times 10^{-7}$	$2.5 \times 10^{-8}$
$5.0 \times 10^{-7}$	$1.1 \times 10^{-7}$
$1.9 \times 10^{-6}$	$1.5 \times 10^{-7}$
$3.2 \times 10^{-6}$	$4.7 \times 10^{-7}$
$5.1 \times 10^{-6}$	$2.7 \times 10^{-6}$
$8.2 \times 10^{-6}$	$4.0 \times 10^{-6}$
$2.2 \times 10^{-5}$	$5.0 \times 10^{-6}$

220

221

222 *c) Parâmetros de crescimento*

223 Para monitorar o crescimento populacional, a amostragem diária da cultura para  
 224 contagem total de células foi realizada usando um citômetro de fluxo (MUSE CELL  
 225 ANALYZER; Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) que é baseado na fluorescência  
 226 natural do pigmento de clorofila. Estes foram usados para plotar as curvas de crescimento  
 227 (em função do tempo). A partir da curva de crescimento, taxas específicas de crescimento,

228 ( $\mu \text{ d}^{-1}$ ), foram calculadas. Isto foi feito pelo ajuste linear da fase de crescimento  
229 exponencial da cultura que foi plotada como o logaritmo natural da densidade celular  
230 (célula  $\text{mL}^{-1}$ ) em função do tempo (dias). O coeficiente angular da linha reta é uma  
231 representação da taxa de crescimento específica. A clorofila *a in vivo* foi obtida pelo  
232 fluorímetro digital (Turner Designs, Trilogy, EUA) a partir de uma curva de calibração  
233 padrão (unidades de fluorescência relativa, RFU, vs concentração de clorofila *a*) realizada  
234 com clorofila *a* extraída de *Chlorella sorokiniana*.

235

236 d) Parâmetros fotossintéticos

237 A fluorescência de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM,  
238 Heinz Walz, Alemanha) foi usada para monitorar os parâmetros fotossintéticos. O  
239 rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) foi determinado diariamente em amostras adaptadas  
240 ao escuro por 20 min para a oxidação completa de PSII. Rendimento quântico efetivo  
241 ( $\Phi'_M$ ) e os quenchings fotoquímicos (qP) e não fotoquímico (NPQ) foram determinadas  
242 em culturas de 48 h. Esses valores foram obtidos de células adaptadas à luz ( $130 \mu\text{mol}$   
243  $\text{fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de acordo com as equações abaixo e descritas em Lombardi e Maldonado  
244 (2011). De maneira breve, inicialmente determinou-se a fluorescência basal inicial  
245 produzidas pelas células adaptadas ao escuro ( $F_0$ ) que foi quantificada sob luz actínica de  
246 baixa intensidade ( $1 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para que não houvesse a redução dos centros de  
247 reação do PSII. Em seguida, aplicou-se um pulso de luz saturante (0.2 s;  $2000 \mu\text{mol fótons}$   
248  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para a determinação da fluorescência máxima ( $F_M$ ). A luz saturante causou uma  
249 total redução do pool acceptor de elétrons dos centros de reação do PSII e induziu um  
250 aumento do sinal de  $F_0$  para o nível máximo ( $F_M$ )

$$251 \quad \Phi_M = F_M - F_0 / F_M \quad (1)$$

252

253 Em seguida, um pulso de luz actínica de  $130 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  foi aplicado a  
254 cada 20 s durante 10 min, alterando a fluorescência em estado estável ( $F'_s$ ) e permitiu a  
255 medida de fluorescência das células adaptadas à luz ( $F'_M$ ) e consequentemente o  
256 rendimento quântico efetivo ( $\Phi'_M$ ). A fluorescência mínima adaptada a luz ( $F'_0$ ) foi  
257 calculada pela equação apresentada em OXBOROUGH e BAKER (1997).

258

259  $\Phi'_M = (F'_M - F'_S) / F'_M$  (2)

260  $qP = F'_M - F'_S / F'_M - F'_O$  (3)

261  $NPQ = [F_M - F'_M] / F'_M$  (4)

262

263 Curvas rápidas de saturação de luz (RLC) foram feitas em 48h usando o  
264 PhytoPAM. Para isto, pulsos crescentes de radiação fotossinteticamente ativa (PAR)  
265 foram aplicados as amostras em intervalos regulares. Os valores de taxa de transporte de  
266 elétrons relativas (rETR) para cada intensidade de luz foram calculados a partir da  
267 multiplicação de PAR ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pelo rendimento qu\u00e2ntico efetivo. As curvas  
268 foram ajustadas de acordo com o modelo matem\u00e1tico proposto em Platt et al. (1980) e os  
269 par\u00e2metros de coeficiente angular no in\u00edcio do RLC ( $\alpha$ ), irradi\u00e2ncia de saturação (Ek) e  
270 taxa m\u00e1xima de transporte de elétrons relativa (rETRmax) foram obtidos a partir do  
271 tratamento matem\u00e1tico da RLC.

272

#### 273 e) *Composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica*

274 As biomol\u00e9culas intracelulares foram determinadas em culturas de 48 h. Para  
275 carboidratos (30 mL) e prote\u00ednas (50 mL) de amostras foram centrifugadas (4400 rpm,  
276 20\u00b0C por 20 min) em centr\u00edfuga refrigerada (Thermo Scientific/Sorvall, Legend XTR,  
277 EUA) e os *pellets* obtidos foram mantidos congelados (-22 \u00b0C) at\u00e9 an\u00e1lise. Para  
278 determinar o total de carboidratos, o m\u00e9todo colorim\u00e9trico baseado em \u00e1cido sulf\u00farico-  
279 UV descrito em ALBALASMEH et al (2013) foi utilizado. A curva de calibra\u00e7\u00e3o foi  
280 realizada com glicose como padr\u00e3o. As prote\u00ednas totais foram quantificadas de acordo  
281 com BRADFORD (1976) utilizando albumina de soro bovino como padr\u00e3o e a extra\u00e7\u00e3o  
282 de prote\u00ednas seguiu o m\u00e9todo em RAUSCH (1981). A determina\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios totais em  
283 100 mL de amostras de cultura foi realizada por cromatografia em camada com detec\u00e7\u00e3o  
284 por ioniza\u00e7\u00e3o em chama (TLC-FID) em um Iatroscan (Iatron Laboratories Inc., Tokyo,  
285 Japan), seguindo SILVA, ECHEVESTE e LOMBARDI (2018). Essa metodologia \u00e9  
286 baseada na metodologia descrita em PARRISH (1989). Os caroten\u00f3ides totais foram  
287 determinados de acordo com WELLBURN (1994) em 3 mL de cultura em crescimento  
288 exponencial. O total de clorofila (48h) foi determinado pelo m\u00e9todo de extra\u00e7\u00e3o proposto  
289 por SHOAF e LIUM (1976) com DMSO, e as concentra\u00e7\u00f5es foram calculadas seguindo  
290 a equa\u00e7\u00e3o proposta por JEFFREY e HUMPHREY (1975) usando leituras de  
291 espectrofot\u00f4metro (664 e 647 nm).

292 Os rendimentos de biomoléculas ( $\text{pg célula}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) foram calculados pela  
293 multiplicação dos valores absolutos da biomolécula ( $\text{pg célula}^{-1}$ ) pela taxa de crescimento  
294 ( $\text{d}^{-1}$ ).

295

296 *f) Análise estatística*

297 Os resultados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e  
298 depois analisados por ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança para detectar  
299 diferenças significativas entre os tratamentos usando o software MiniTab 17.

300

301

302                    RESULTADOS

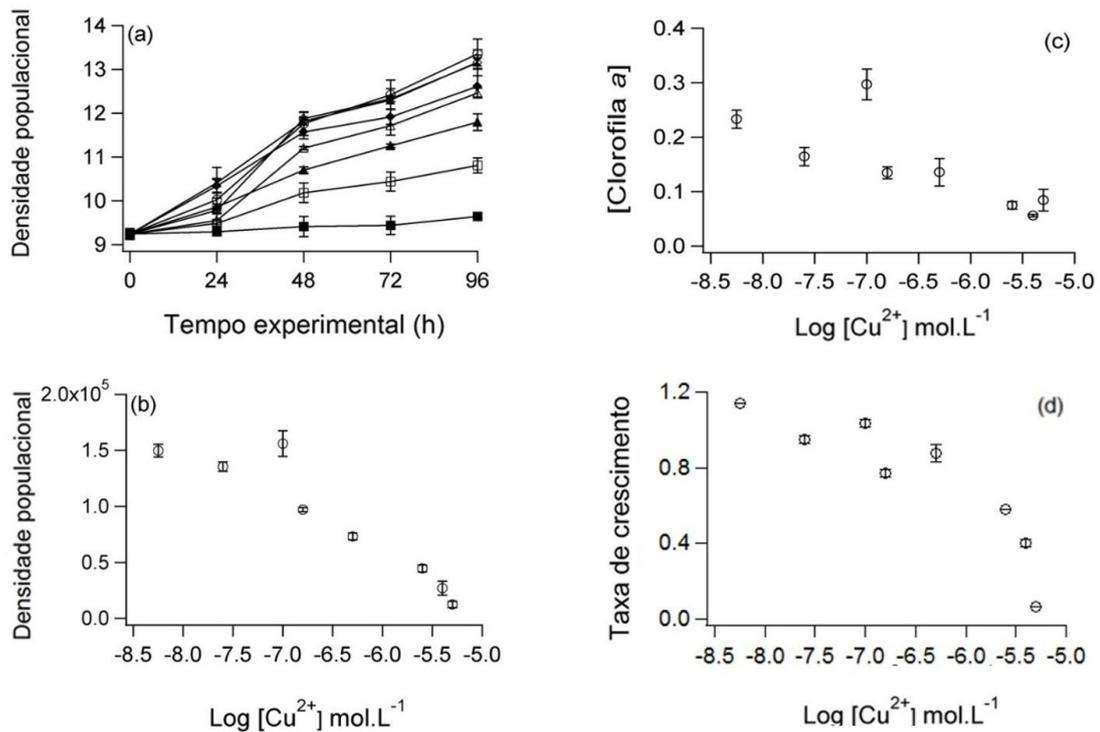
303    *Efeitos do cobre nos parâmetros de crescimento*

304                    A densidade populacional, a concentração de clorofila *a* e as taxas de crescimento  
305 de *Chlorolobion braunii* expostas ao cobre em função do tempo são apresentadas na  
306 figura 2.

307                    Ao final do experimento não houve diferenças significativas entre a densidade  
308 populacional em  $2,5 \times 10^{-8}$ ,  $1,1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> e o controle ( $5,7 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>), como  
309 mostrado na fig. 2a. No entanto, a partir de  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> houve decréscimo  
310 significativo no crescimento populacional. A densidade populacional (fig. 2b) e a  
311 concentração de clorofila *a* (fig. 2c) em 48 h diminuíram gradualmente à medida que os  
312 íons de Cu<sup>2+</sup> livre aumentaram no meio de cultura. Da mesma forma, as taxas de  
313 crescimento, que foram baseadas na densidade celular até 48 h, diminuíram com o  
314 aumento do cobre e refletiram a sensibilidade de *C. braunii* a este metal (fig. 2d). A taxa  
315 de crescimento no controle foi de  $1,14 \text{ d}^{-1}$ , mas diminuiu acentuadamente na concentração  
316 de  $2,7 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> livre e acima. A taxa de crescimento de *C. braunii* começou a  
317 diminuir em  $2,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>, quando foi 17% menor que o controle (ANOVA,  $p$   
318  $<0,05$ ) e reduzida a ~ 93% na maior concentração de cobre ( $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

319

320



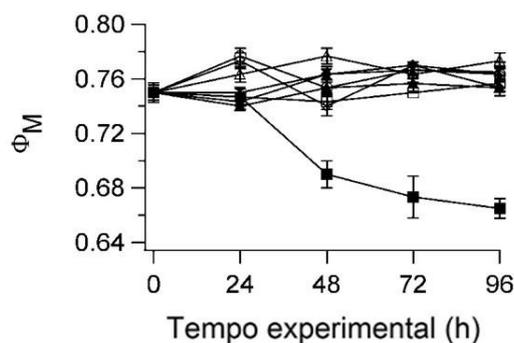
321

322 **Figura 2.** Parâmetros de crescimento obtidos durante 96 h para culturas de *C. braunii*.  
 323 Densidade populacional ( $\text{Ln} [\text{células mL}^{-1}]$ ) em função do tempo experimental (a);  
 324 densidade populacional em 48 h (b); clorofila *a* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em 48 h (c); taxas de  
 325 crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) (d) em função da concentração de  $\text{log Cu}^{2+}$  livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Os símbolos  
 326 aplicam-se a concentrações de cobre livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ): círculo aberto  $5.7 \times 10^{-9}$ , ampulheta  
 327 fechada  $2.5 \times 10^{-8}$ , diamante aberto  $1.1 \times 10^{-7}$ , diamante fechado  $1.5 \times 10^{-7}$ , triângulo aberto  
 328  $4.7 \times 10^{-7}$ , triângulo fechado  $2.7 \times 10^{-6}$ , quadrado aberto  $4 \times 10^{-6}$ , quadrado fechado  $5 \times 10^{-6}$ .  
 329 Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

330

### 331 *Efeitos do cobre nos parâmetros PAM*

332 O rendimento fotossintético máximo ( $\Phi_M$ ) obtido diariamente para culturas de *C.*  
 333 *braunii* em função do tempo experimental é relatado na figura 3. Ele diminuiu na maior  
 334 concentração de cobre livre ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ) após 48 horas de exposição e daí em  
 335 diante, mas para as outras concentrações de cobre os valores foram  $\sim 0,75$  sem variação  
 336 ao longo do tempo experimental.

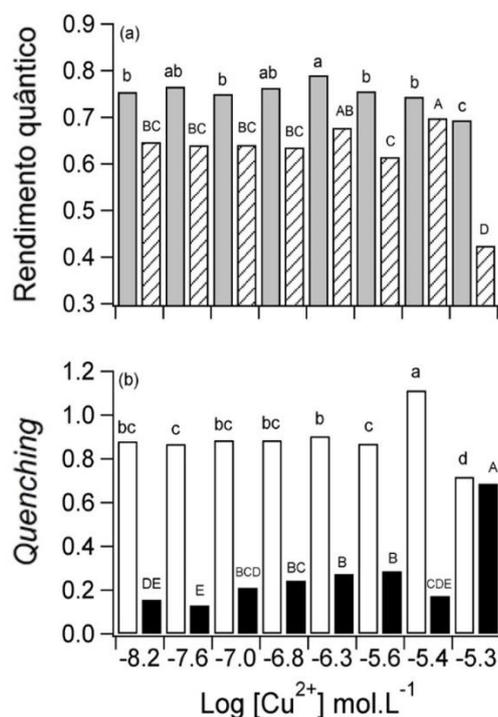


337

338 **Figura 3.** Rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) de PSII relatado em unidades de  
 339 fluorescência relativa (R.U.) em função do tempo experimental em culturas de *C. braunii*.  
 340 Os símbolos aplicam-se a concentrações de cobre livre (mol L<sup>-1</sup>): círculo aberto 5.7x10<sup>-9</sup>,  
 341 ampulheta fechada 2.5x10<sup>-8</sup>, diamante aberto 1.1x10<sup>-7</sup>, diamante fechado 1.5x10<sup>-7</sup>,  
 342 triângulo aberto 4.7x10<sup>-7</sup>, triângulo fechado 2.7 x10<sup>-6</sup>, quadrado aberto 4x10<sup>-6</sup>, quadrado  
 343 fechado 5x10<sup>-6</sup>. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

344

345 A Figura 4 reporta rendimentos quânticos do PSII (fig. 4a) e *quenchings* de  
 346 fluorescência (fig. 4b) em 48 h de exposição ao cobre para todos os tratamentos.  
 347 Concentrações de cobre ambientalmente relevantes não afetaram significativamente esses  
 348 parâmetros de fluorescência ( $\Phi_M$ ,  $\Phi'_M$ ) até 4,0x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> livre. Da mesma  
 349 forma, a extinção da fluorescência qP foi menor em 5,0x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> (ANOVA, p  
 350 <0,05), a maior concentração testada. O *quenching* não fotoquímico (NPQ) aumentou  
 351 cerca de 43% em comparação com o controle de 1,5x10<sup>-7</sup> a 2,7x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>  
 352 (ANOVA, p <0,05). Observamos que foi apenas na concentração livre de Cu<sup>2+</sup> de  
 353 5,0x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>, quando o NPQ foi 81% maior que o controle, que os parâmetros  
 354 fotossintéticos qP,  $\Phi_M$ ,  $\Phi'_M$  diminuíram (ANOVA, p <0,05).



355

356 **Figura 4.** Parâmetros de fluorescência do PSII em 48 h em função da concentração de  
 357 cobre livre. Rendimento quântico (a) e *quenchings* (b). Símbolos da barra: cinza,  
 358 rendimento quântico máximo; tracejada, rendimento quântico operacional; branco,  
 359 *quenching* fotoquímico; preto, *quenching* não fotoquímico dissipado na forma de calor  
 360 (NPQ). Estatística: letras iguais acima das barras não indica diferença significativa  
 361 (ANOVA  $p > 0,05$ ).

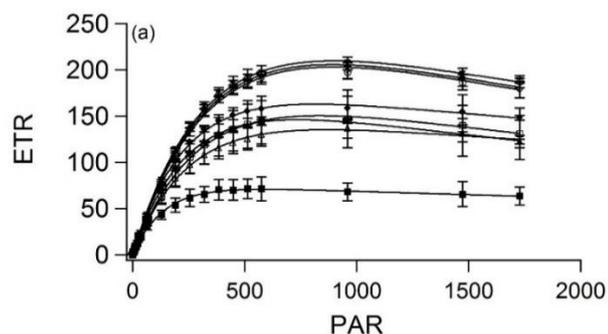
362

### 363 *Efeitos do cobre no RLC*

364 As curvas rápidas de saturação de luz para todos os tratamentos são apresentadas  
 365 na figura 5, onde os efeitos negativos do cobre na ETR podem ser vistos. Das  
 366 concentrações mais baixas de cobre ( $5,7 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>) até as concentrações de cobre livre  
 367 mais elevadas ( $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), a ETR diminuiu de ~ 200 para 50 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

368

369



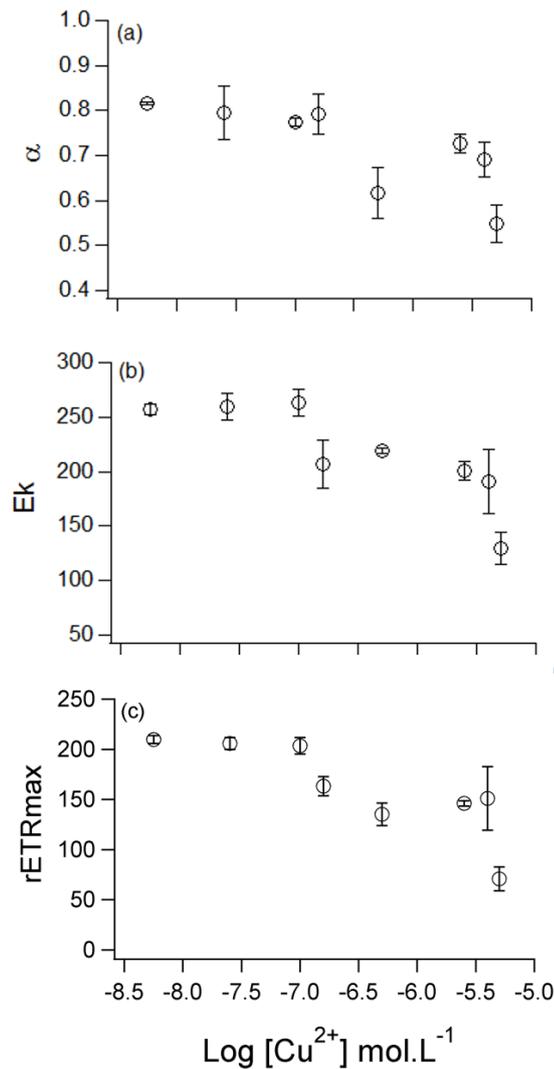
370

371 **Figura 5.** Curvas rápidas de luz (RLC) em 48 h de exposição de cobre representada como  
 372 taxa relativa de transporte de elétrons (ETR,  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da radiação  
 373 fotossinteticamente ativa (PAR,  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Os símbolos aplicam-se a  
 374 concentrações de cobre livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ): círculo aberto  $5.7 \times 10^{-9}$ , ampulheta fechada  
 375  $2.5 \times 10^{-8}$ , diamante aberto  $1.1 \times 10^{-7}$ , diamante fechado  $1.5 \times 10^{-7}$ , triângulo aberto  $4.7 \times 10^{-7}$ ,  
 376 triângulo fechado  $2.7 \times 10^{-6}$ , quadrado aberto  $4 \times 10^{-6}$ , quadrado fechado  $5 \times 10^{-6}$ . As linhas  
 377 representam o melhor ajuste dos dados de acordo com Platt et al. (1980). Barras de erro  
 378 representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

379

380 Os resultados relacionados aos parâmetros obtidos após o tratamento matemático  
 381 do RLC,  $E_k$  (fig. 6b) e  $rETR_m$  (fig. 6c) confirmaram que a  $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e acima, o  
 382 cobre afetou o aparato fotossintético das microalgas. Aqui, os parâmetros mais sensíveis  
 383 foram  $E_k$  e  $rETR_m$ , seguidos por  $\alpha$  (6a) a  $4,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  livres.

384



385

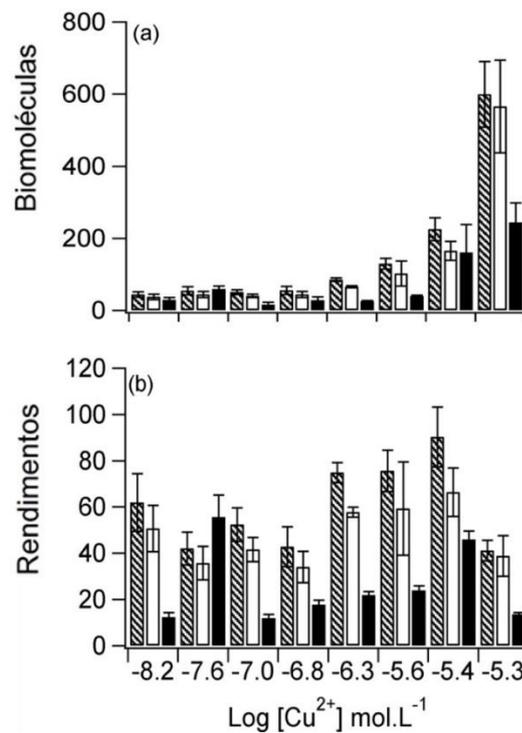
386 **Figura 6.** Parâmetros relacionados com a fotossíntese obtidos após o ajuste de RLC de  
 387 acordo com Platt et al. (1980) relatado em função do log da concentração de Cu<sup>2+</sup> livre  
 388 (mol L<sup>-1</sup>). Em 7a (α), 7b (Ek) e 7c (rETRmax). Barras de erro representam o desvio padrão  
 389 da média (n = 3).

390

### 391 *Efeitos do cobre nas biomoléculas*

392 A produção de biomoléculas é mostrada na figura 7. Enquanto o conteúdo  
 393 absoluto relatado como concentração (pg célula<sup>-1</sup>) de carboidratos, lipídios ou proteínas  
 394 aumentou na concentração de cobre mais alta (7a), os rendimentos de biomoléculas (pg  
 395 célula<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se comportou de maneira diferente. *C. braunii* exposta a concentrações de  
 396 Cu<sup>2+</sup> de 4,7x10<sup>-7</sup> a 4,0x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> apresentou rendimento máximo de proteínas (~ 80 pg  
 397 célula<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). O valor mais alto para produção de lipídios totais foi de aproximadamente

398 45 pg célula<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> em concentrações tão baixas quanto 2,5x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> de cobre livre.  
399 Nenhum aumento na produção de carboidratos foi observado em todo o experimento.



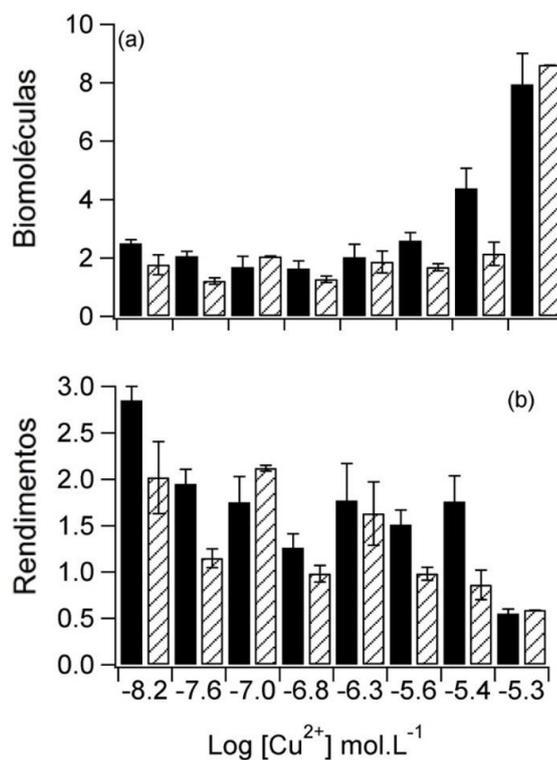
400

401 **Figura 7.** Biomoléculas totais em 48h para culturas de *C. braunii* em função das  
402 concentrações de cobre testadas representadas como proteínas (barras tracejadas),  
403 carboidratos (barras brancas), lipídios (barras pretas). Em (a) valores absolutos de  
404 biomoléculas (pg célula<sup>-1</sup>; os valores de carboidratos foram multiplicados por 3 e lipídios  
405 por 10), e em (b) rendimento de biomoléculas (pg célula<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Barras de erro representam  
406 o desvio padrão da média (n = 3).

407

408 Os pigmentos clorofila *a* e carotenóides em função dos íons de cobre livres são  
409 mostrados na figura 8. Considerando-se as concentrações absolutas eles aumentaram na  
410 maior concentração de cobre testada, mas no caso dos pigmentos, seu rendimento  
411 diminuiu gradualmente com o aumento de cobre.

412



413

414 **Figura 8.** Pigmentos totais em *C. braunii* em culturas de 48 h para as concentrações de  
 415 cobre testadas representadas como clorofila *a* (barras tracejadas) e carotenóides (barras  
 416 pretas). Em (a) valores absolutos de biomoléculas (pg.cell<sup>-1</sup>) e em (b) rendimento de  
 417 biomoléculas (pg célula<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n =  
 418 3).

419

420

421

422

423

424

425

426

## 427 DISCUSSÃO

428

### 429 *Efeitos do cobre nos parâmetros de crescimento*

430 Em geral, os efeitos do cobre sobre *C. braunii* mostraram padrões diferentes  
431 quando se trata de diferentes aspectos do metabolismo. As taxas de crescimento e  
432 clorofila *a* foram os aspectos que primeiro diminuíram após a exposição à concentração  
433 de cobre livre de  $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , uma concentração sub-letal, sem efeito nos parâmetros  
434 fotossintéticos. Embora não haja consenso se a divisão celular ou a fotossíntese são  
435 afetadas primeiro em situações de exposição ao cobre, a maioria dos resultados até o  
436 momento mostra que, em microalgas, é provável que os parâmetros de crescimento sejam  
437 afetados em concentrações mais baixas. Em concordância com nossos resultados,  
438 LOMBARDI e MALDONADO (2011) mostraram que a taxa de crescimento foi o  
439 parâmetro mais sensível ao cobre em *Phaeocystis cordata*, uma Haptophyta oceânica. Da  
440 mesma forma, investigando os efeitos do cobre em *Scenedesmus incrassatulus*,  
441 (PERALES-VELA et al. (2007) relataram que a produção de biomassa foi o parâmetro  
442 mais sensível ao cobre, diminuindo significativamente em comparação com o controle a  
443  $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre total em um meio de cultura contendo EDTA, um ligante sintético  
444 de metal. KNAUER, BEHRA e SIGG (1997) estudaram os efeitos do cobre e do zinco  
445 no crescimento de 5 espécies de microalgas com valores nominais de cobre variando de  
446  $10^{-15}$  a  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura contendo EDTA. Eles observaram que para  
447 *Chlorella fusca* em concentrações maiores que  $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre nominal as taxas de  
448 crescimento diminuía. Eles mostraram que *Chlamydomonas reinhardtii* era mais  
449 sensível ao cobre e que concentrações de  $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre era prejudicial à divisão  
450 celular, diminuindo sua taxa de crescimento. Mais recentemente, ECHEVESTE, SILVA  
451 e LOMBARDI (2017) mostraram redução da taxa de crescimento em *C. braunii* a  
452 aproximadamente  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de íons livres de cobre, mas o rendimento máximo  
453 fotossintético necessitou de concentrações maiores de cobre para que qualquer efeito  
454 fosse detectado. Da mesma forma, SILVA, ECHEVESTE e LOMBARDI (2018)  
455 mostraram que *Scenedesmus quadricauda* exposta ao cobre teve sua taxa de crescimento  
456 diminuída em concentrações de cobre livre tão baixas quanto  $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  e que este  
457 parâmetro foi mais sensível ao cobre que o rendimento máximo fotossintético. No  
458 entanto, MIAO, WANG e JUNEAU (2005) objetivando uma comparação entre  
459 parâmetros de crescimento e fluorometria de PAM, expôs 4 espécies de fitoplâncton

460 marinho (*Dunaliella tertiolecta*, *Prorocentrum minimum*, *Synechococcus sp.* e  
461 *Thalassiosira weissflogii*) a concentrações de Cu livre ambientalmente relevantes ( $10^{-11}$   
462 a  $10^{-8.7}$  mol L<sup>-1</sup>) entre outros metais. Os autores mostraram sensibilidade similar tanto  
463 para os parâmetros fotossintéticos quanto para as taxas de crescimento espécie-  
464 específicas. Foi proposto que, em situações de estresse por metal, as plantas podem usar  
465 a energia originalmente designada para o crescimento para outros processos celulares  
466 necessários para controlar e manter a homeostase celular (PRASAD e HAGEMEYER,  
467 1999) e também proteger o aparato fotossintético (REYNOLDS, 2006), assim, as taxas  
468 de crescimento seriam afetadas mais cedo do que os parâmetros fotossintéticos.

469 A concentração de clorofila *a* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) começou a diminuir nas concentrações  
470 de cobre ambientais ( $2,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e continuou nas maiores concentrações de cobre.  
471 O decréscimo de 65% da clorofila em  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> mostra que *C. braunii* é mais  
472 sensível que *Pavlova viridis* que apresentou redução de ~ 27% a  $4,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> Cu,  
473 como relatado em LI et al., (2006), e KALINOWSKA e PAWLIK-SKOWROŃSKA,  
474 (2010) que obtiveram redução de ~ 20% a  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre total em meio com  
475 EDTA para *Stichococcus minor*. AFKAR e FATHI, (2010) obtiveram redução de ~ 72%  
476 no teor de clorofila *a* com o aumento da concentração de cobre de  $10^{-8}$  para  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>  
477 em estudos com *Chlorella vulgaris*. PERALES-VELA et al (2007) investigaram  
478 *Scenedesmus incrassatulus* com concentrações de cobre entre  $6 \times 10^{-7}$  e  $3 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  
479 observaram decréscimo nas concentrações de clorofila *a* e no crescimento, em  $6 \times 10^{-7}$  mol  
480 L<sup>-1</sup>. Nosso resultado está de acordo com a literatura e indica que mesmo em concentrações  
481 tão baixas quanto as encontradas hoje no ambiente (ASARE et al., 2018; TONIETTO et  
482 al., 2015; TONIETTO; GRASSI, 2012), as microalgas podem enfrentar dificuldades em  
483 relação à exposição ao cobre. De acordo com BARON, ARELLANO e GORGÉ (1995),  
484 SANDMANN e BÖGER, (1980) e SABATINI et al., (2009) a diminuição no teor de  
485 clorofila *a* pode ser devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso  
486 de cobre, o que, por sua vez, pode levar à peroxidação da membranas de cloroplastos  
487 (CONTRERAS, MOENNE e CORREA, (2005).

#### 488 *Efeitos do cobre nos parâmetros PAM*

489 Apesar da lesão que o baixo teor de clorofila pode causar às microalgas  
490 fotossintéticas, não foi obtida correlação entre os rendimentos fotossintéticos ( $\Phi_M$ ,  $\Phi_M$ ) e  
491 qP, e os íons cobre, exceto a diminuição abrupta na maior concentração testada ( $5 \times 10^{-6}$

492 mol L<sup>-1</sup> de cobre livre). A falta de variação ou menor sensibilidade dos parâmetros  
493 fotossintéticos ( $\Phi_M$ ,  $\Phi'_M$ , qP) em *C. braunii* em comparação com os parâmetros de  
494 crescimento sob exposição ao cobre sugere que o aparato fotossintético não é o primeiro  
495 alvo para a toxicidade do cobre, mas sim a divisão celular. Nossos resultados concordam  
496 com os de ECHEVESTE, SILVA e LOMBARDI (2017) que observaram decréscimo do  
497  $\Phi_M$  na mesma espécie *C. braunii* com o aumento na concentração de cobre de  $2,5 \times 10^{-9}$   
498 para  $3,7 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>.

499 Em relação ao rendimento quântico máximo, PERALES-VELA et al. (2007)  
500 mostraram que *Scenedesmus incrassatulus* teve redução de 13% na concentração total de  
501 cobre de  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em relação ao controle. Ressaltamos aqui que, como o meio de  
502 cultura continha EDTA, não sabemos a concentração de cobre livre, o que dificulta a  
503 comparação com nossos dados. Os autores sugerem que o cobre promove uma redução  
504 dos centros de reação ativa do PSII e da separação de carga primária, levando a  
505 diminuição do rendimento quântico do PSII e da taxa de transporte de elétrons. DEWEZ  
506 et al., (2005) atribuíram a diminuição do rendimento de fluorescência em *Scenedesmus*  
507 *obliquus* exposto ao cobre à inibição do transporte de elétrons do PSII via Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> e pool  
508 de plastoquinona.

509 Entre os parâmetros fotossintéticos que foram mais sensíveis às concentrações de  
510 cobre estão NPQ, Ek e rETR<sub>max</sub> obtidos após o tratamento matemático do RLC. O  
511 aumento do NPQ em concentração de Cu<sup>2+</sup> de  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, dissipado por *C. braunii*,  
512 está de acordo com a maioria da literatura que investiga os efeitos de íons metálicos no  
513 aparato fotossintético de microalgas. Os rendimentos  $\Phi_M$ ,  $\Phi'_M$  e qP foram mais  
514 conservados e valores inferiores ao controle foram detectados apenas nas concentrações  
515 de cobre livre de  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, sem tendência de diminuição gradual. Relacionar a  
516 observação de REYNOLDS (2006) e a função do NPQ, isto é, dissipação de calor que  
517 atua como um sistema de proteção para o aparelho fotossintético, é razoável já que o NPQ  
518 aumentou nas concentrações de metais que afetaram a taxa de crescimento,  $1,5 \times 10^{-7}$  mol  
519 L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> livre. A dissipação de energia NPQ é uma forma de dissipação fotoprotetora  
520 do excesso de energia luminosa, a fim de evitar danos ao aparato fotossintético MULLER,  
521 (2001) pela ativação do ciclo da xantofila (FIGUEROA, JEREZ e KORBEE, 2013;  
522 KROMKAMP et al., 2008). O aumento do NPQ em  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre indica que  
523 os mecanismos de fotoproteção em *C. braunii* foram preservados mesmo em  
524 concentrações tão altas quanto  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, mas como apresentado em JUNEAU,

525 BERDEY e POPOVIC (2002), a taxa de transporte de elétrons poderia ter sido inibida.  
526 ECHEVESTE, SILVA e LOMBARDI (2017) também mostraram aumento de NPQ ao  
527 investigar os efeitos do cobre nos parâmetros fotossintéticos de *C. braunii*. O aumento no  
528 NPQ que obtivemos sugere que o complexo antena poderia estar com problemas,  
529 prejudicando a absorção de luz em alta intensidade. Como demonstramos no presente  
530 estudo, se concentrações tão baixas quanto  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de íons livres de Cu<sup>2+</sup>  
531 causaram a ativação do sistema de fotoproteção NPQ, é uma indicação de que em  
532 situações ambientais *C. braunii* pode enfrentar problemas semelhantes.

533 Uma grande parte da literatura recente (CHEN et al., 2016; WANG;  
534 SATHASIVAM; KI, 2017; YONG et al., 2018) relatam os efeitos do cobre no  
535 fitoplâncton baseado em concentrações totais ou nominais de cobre, que é conhecido por  
536 ter baixa correlação com a biodisponibilidade e é dependente da composição do meio. Os  
537 pesquisadores devem estar cientes de que especificar a concentração total de cobre ou  
538 outro metal necessário para causar um efeito é inútil quando o organismo é microalga.  
539 Isso ocorre porque os íons devem passar através da membrana celular para efetivamente  
540 causar um efeito metabólico (LOMBARDI; VIEIRA; SARTORI, 2002) e as  
541 concentrações totais estão sujeitas a grande variação em consequência da composição do  
542 meio de cultura, que geralmente contém EDTA que é necessário para a disponibilidade  
543 correta de metais traços, particularmente ferro.

544 A diminuição no qP (menor energia direcionada à fotoquímica) obtida para *C.*  
545 *braunii* exposta ao cobre pode estar relacionada com centros abertos de reação como  
546 discutido em MAXWELL e JOHNSON (2000) ou com uma diminuição no estado  
547 oxidado da quinona A (Q<sub>A</sub>). (TRISSIL e LAVERGNE, 1994). Segundo BELSHE,  
548 DURAKO e BLUM (2007), em situações estressantes, as microalgas podem responder  
549 diminuindo a absorção de energia luminosa para reduzir os danos que o excesso de luz  
550 pode causar, o que consequentemente resulta em menores rendimentos quânticos (e  
551 menor qP).

#### 552 *Efeito do cobre no RLC*

553 As curvas rápidas de saturação de luz permitem avaliar ajustes no funcionamento  
554 do aparelho fotossintético à medida que a intensidade da luz aumenta, envolvendo  
555 mecanismos de fotoproteção e ocorrência de fotoinibição (SCHREIBER et al., 1997).  
556 Vale a pena notar que, embora nenhum efeito foi detectado sobre os rendimentos

557 quânticos de fluorescência e qP em baixos e intermediários níveis de cobre, RLC mostrou  
558 diferenças entre essas concentrações de cobre. Comparando os três parâmetros ( $\alpha$ ,  $E_k$  e  
559  $rETR_{max}$ ) que foram calculados a partir do RLC,  $E_k$  e  $rETR_{max}$  decresceram a partir de  
560  $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e foram mais sensíveis ao cobre, enquanto  $\alpha$  respondeu mais tarde. A  
561 diminuição gradual desses parâmetros quando o cobre aumentou na cultura confirma seu  
562 efeito sobre a capacidade das células de lidar com a luz incidente. Isso mostra que, no  
563 ambiente natural, onde há um aumento na intensidade da luz desde o alvorecer até seu  
564 pico máximo e subsequente decaimento ao anoitecer, as microalgas expostas ao cobre em  
565 concentrações próximas a  $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  podem enfrentar limitações da fotossíntese.

566  $E_k$  reflete a aclimação das células à luz (SAKSHAUG et al., 1997) e se a luz  
567 estiver mudando constantemente,  $E_k$  também mudará. Em nossos experimentos,  $E_k$   
568 diminuiu com o aumento do cobre; este comportamento pode estar relacionado aos efeitos  
569 do cobre diretamente no aparato fotossintético ou indiretamente através do estresse  
570 oxidativo (KÜPPER et al., 2002). Ambos podem aumentar a fotossensibilidade das algas.  
571 YONG et al. (2018) observaram redução nos valores de  $E_k$  e aumento de NPQ em *S.*  
572 *quadricauda* expostos ao cobre (concentração total de metal relatada), indicando que o  
573 metal danificou o aparato fotossintético da microalga *S. quadricauda*. Segundo os  
574 autores, o efeito de inibição promovido pelo cobre na fotoquímica de PSII está  
575 relacionado à interferência da quebra de água durante o processo fotossintético, que  
576 resulta em excesso de energia de excitação que é então dissipada como NPQ. Isso também  
577 está relacionado às outras respostas fotossintéticas, como  $\alpha$  e  $rETR_m$ . Segundo  
578 SCHREIBER (2004)  $\alpha$  é definido como o aumento da curva na região limitante da luz e  
579 proporcional à eficiência da captação de luz. Uma vez que  $\alpha$  e  $rETR_m$  diminuíram com o  
580 aumento de cobre, podemos racionalizar que tanto a separação de carga quanto o fluxo  
581 de elétrons a jusante no PSII estavam sendo afetados mesmo em concentrações tão baixas  
582 quanto  $4,7 \times 10^{-7}$  e  $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre livre, respectivamente. Ao todo, estes levam  
583 a diminuição dos parâmetros de RLC com o aumento dos íons de cobre, inibindo a  
584 atividade do PSII. QIAN et al., (2009) utilizaram PCR em tempo real e mostraram que *C.*  
585 *vulgaris* exposta a concentrações de cobre total 10 vezes maior do que aquela em que  
586 detectamos os primeiros efeitos, a abundância de transcritos gênicos relacionados à  
587 fotossíntese (*psbA* e *rbcL*) diminuiu. Os autores demonstraram que Cu (e Cd) inibiram  
588 de forma independente a atividade do PSII e a assimilação de  $\text{CO}_2$ .

589 *Efeitos do cobre nas biomoléculas*

590 O aumento de 15 vezes do total de carboidratos por célula em relação ao controle  
591 na maior concentração de cobre ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) está de acordo com os resultados da  
592 literatura. CHIA, LOMBARDI e MELÃO (2013) expuseram *C. vulgaris* ao estresse por  
593 Cd e mostraram um aumento de biomoléculas com o aumento do metal em meio de  
594 cultura. Da mesma forma, SILVA et al. (2018) mostraram que *Scenedesmus quadricauda*  
595 aumentou em 15 vezes o conteúdo de carboidratos em comparação com o controle quando  
596 exposta a  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de íons cobre. Se considerarmos que em  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre  
597 livre *C. braunii* (neste estudo) estava enfrentando dificuldades fotossintéticas, esse  
598 aumento de carboidratos poderia ser resultado da diminuição dos processos catabólicos e  
599 não da sua produção através da fixação de carbono.

600 O aumento de lipídios totais em 8 vezes, em comparação com o controle, à custa  
601 da taxa de crescimento em nossa maior concentração de cobre ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) está de  
602 acordo com a maioria dos resultados da literatura sobre o aumento de lipídios em  
603 condições de estresse. Em comparação com o respectivo controle, SILVA et al. (2018)  
604 obtiveram um aumento de 5 vezes no total de lipídios em *S. quadricauda* exposta a  
605  $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  íons de cobre livre. ZHU (2015) aponta que os metais  
606 traço podem ser uma estratégia promissora para o aumento da produção de lipídios nas  
607 microalgas. O acúmulo de lipídios nas microalgas em detrimento da taxa de crescimento  
608 é comum (células que não se dividem, tendem a acumular biomoléculas desde que sejam  
609 metabolicamente ativas) e a literatura mostra que quanto pior a condição de estresse,  
610 maior o acúmulo de lipídios (CHIA; GALADIMA; JAPHET, 2015b; HU et al., 2008;  
611 LOMBARDI; WANGERSKY, 1991). CHIA et al. (2013) mostraram que o acúmulo de  
612 lipídios em *C. vulgaris* depletadas de nitrogênio ou fósforo pode ser amplificado se essas  
613 células depletadas de nutrientes forem expostas ao cádmio. Os autores mostraram que o  
614 triacilglicerol pode abranger 62% da biomassa seca em comparação com 1% no controle,  
615 mas novamente isso acontece em detrimento da taxa de crescimento. REN et al., (2014)  
616 expuseram *Scenedesmus sp* a  $\sim 2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e obtiveram  $\sim 4,5$  vezes  
617 maior concentração de lipídios e  $\sim 4,1$  vezes maior produção de lipídios em comparação  
618 com o controle, mas em concentrações de  $\text{Fe}^{3+}$  ainda mais altas não ocorreu ganho  
619 lipídico.

620 O aumento de proteínas totais (13 vezes) a  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre livre em  
621 relação ao controle obtido nesta pesquisa está de acordo com a literatura (CHIA;  
622 LOMBARDI; MELÃO, 2013; ROCHA et al., 2016; SILVA; ECHEVESTE;

623 LOMBARDI, 2018). Nossos resultados sugerem que as proteínas acumuladas podem não  
624 ser estruturais, mas sim proteínas de ligação a metais que reduzem a biodisponibilidade  
625 do cobre, como as fitoquelatinas SUNDA e HUNTSMAN (1998). No entanto, esse  
626 aumento elevado pode ter a contribuição de um declínio na degradação de proteínas,  
627 como apontado por CHIA et al. (2015). SILVA et al. (2018) investigaram a fisiologia de  
628 *Scenedesmus quadricauda* exposta ao cobre e obtiveram o maior teor de proteína, 6x  
629 maior que o controle na concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  livre de  $8.2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , onde a taxa  
630 de crescimento foi estatisticamente semelhante ao controle. No entanto, DE ABREU et  
631 al., (2014) observaram diminuição de proteínas em *C. vulgaris* expostas a uma  
632 concentração total de cobre de  $\sim 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

633 A maior parte do aumento relatado de biomoléculas de microalgas, sejam lipídios,  
634 carboidratos ou proteínas, é obtido à custa das taxas de crescimento. Isto é devido à  
635 condição altamente estressante imposta pelo aumento de metal residual que é necessário  
636 para acionar o acúmulo de biomoléculas. No entanto, como já discutido em ZHU (2015)  
637 concentrações baixas ou intermediárias de cobre, onde pouco comprometimento da taxa  
638 de crescimento é obtido, um aumento significativo no rendimento de biomoléculas (célula  
639  $\text{pg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) pode ser obtido. Sob os olhos da biotecnologia, isso pode ser considerado uma  
640 técnica de biomanipulação. Este foi o caso do rendimento de proteínas 33% maior que  
641 obtivemos expondo *C. braunii* à faixa de cobre livre de  $4,7 \times 10^{-7}$  a  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Vale  
642 ressaltar que aproximadamente 15 vezes menor concentração de cobre livre ( $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol}$   
643  $\text{L}^{-1}$ ) foi necessária para aumentar o rendimento lipídico em comparação com o rendimento  
644 de proteínas em *C. braunii*. No entanto, deve-se estar ciente de que, ao usar a técnica de  
645 biomanipulação, a qualidade dos lipídios acumulados ou de outras biomoléculas pode ser  
646 diferente em comparação com a produzida em condições saudáveis. CHIA et al. (2013)  
647 mostraram 3,5 vezes mais lipídios em *Chlorella vulgaris* expostas a  $2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de Cd  
648 livre, mas ácidos graxos saturados (SAFA) aumentaram em detrimento de ácidos graxos  
649 poliinsaturados (PUFA). Portanto, se alguém pretende manipular a biomassa de algas  
650 para o aumento de lipídios, a aplicação da biomassa deve ser considerada, uma vez que  
651 usá-la como matéria-prima na aquicultura pode levar ao aumento da SAFA nos animais  
652 aquáticos.

653 Em relação aos pigmentos (clorofila *a* e carotenóides totais), a quantidade absoluta  
654 se comportou de forma semelhante às outras biomoléculas (valores altos na maior  
655 concentração de cobre -  $\text{pg célula}^{-1}$ ), mas não reconhecemos um ponto-gatilho ou uma

656 faixa de concentração de cobre livre que resultou no aumento do rendimento do pigmento  
657 ( $\text{pg célula}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). ECHEVESTE et al. (2017), no final do período de 96 h, observaram um  
658 aumento no conteúdo absoluto de clorofila por célula de 57% a  $\sim 10^{-8}$  e de 82% em  
659  $3,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu livre. Similarmente, JIANG et al., (2016) obtiveram aumento  
660 gradual do teor absoluto de clorofila *a* ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) em microalgas expostas a  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol}$   
661  $\text{L}^{-1}$  de cobre total. No entanto, concentrações mais elevadas de cobre causaram a redução  
662 do conteúdo absoluto deste pigmento; os autores sugerem que o aumento foi devido a  
663 uma redução da divisão celular, causando um acúmulo intracelular de clorofila *a*.  
664 BOSSUYT e JANSSEN (2004) investigaram *Pseudokirchneriella subcapitata* exposta a  
665 concentrações de cobre total que variaram entre  $7 \times 10^{-9}$  e  $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de  
666 cultura com ligantes metálicos e observaram um aumento no teor de clorofila *a* e  
667 carotenóides por célula, com aumento da concentração de cobre no meio. Para a clorofila  
668 *a* os autores obtiveram duas vezes mais pigmento a  $7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , mas 20x mais nas  
669 células expostas a  $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em comparação ao controle. Para os carotenóides, os  
670 autores mostraram um aumento de 2x e 7x, respectivamente, nas duas concentrações de  
671 cobre mencionadas. Os carotenóides estão relacionados à proteção do PSII ao excesso de  
672 fótons que podem ser causados por danos oxidativos, promovendo a dissipação de energia  
673 na forma de calor (NPQ) (REYNOLDS 2006). O aumento do teor de carotenóides na  
674 maior concentração de cobre pode ser o resultado do estresse oxidativo causado pelo  
675 metal, mas não houve ganho na quantidade deste pigmento ao considerar a taxa de  
676 crescimento. Este aumento é um mecanismo de fotoproteção através do ciclo da xantofila  
677 (FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013).

678 QIAN et al., (2009) mostraram que *Chlorella vulgaris* expostas a concentrações  
679 de cobre de  $5 \times 10^{-7}$  e  $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  apresentaram taxa de crescimento e teor de clorofila  
680 menores que o controle, mas maior ROS do que o controle. Segundo os autores, o  
681 aumento das ROS leva à ruptura dos mecanismos de síntese da clorofila *a*. Isso pode ter  
682 contribuído para a falta de aumento no rendimento de pigmentos obtidos na presente  
683 pesquisa. Nossos resultados estão de acordo com ABALDE et al., (1995) que mostraram  
684 diminuição nos carotenóides em *Dunaliella tertiolecta* exposta a  $\sim 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  
685 cobre total. Observamos que, embora a concentração usada em ABALDE et al (1995)  
686 seja cerca de 100 vezes maior do que a nossa, tanto o seu quanto o nosso meio de cultura  
687 possuíam EDTA, mas enquanto os autores se referem ao cobre total, relatamos nossas  
688 concentrações como íons livres de cobre. Se considerarmos a produção de clorofila *a* e

689 de carotenóides, a redução gradual observada terá a contribuição da diminuição gradual  
690 das taxas de crescimento à medida que o cobre aumenta. Assim, a produção de  
691 biomoléculas da biomassa de algas pode ser manipulada, como lipídios, proteínas,  
692 carboidratos, clorofilas e talvez carotenóides, mas isso depende da concentração do metal  
693 utilizado.

694

695

696

## 697 CONCLUSÃO

698

699 O metabolismo de *Chlorolobion braunii* foi afetado por concentrações de cobre  
700 livre tão baixas quanto  $2,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. O primeiro parâmetro a ser afetado  
701 negativamente foi o crescimento, seguido pela concentração de clorofila *a* e a densidade  
702 populacional. A fotossíntese, avaliada pelo rendimento quântico máximo e efetivo e por  
703 qP, foi afetada apenas na concentração de cobre livre de  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, a mais alta que  
704 testamos. No entanto, o NPQ aumentou em  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre, confirmando  
705 que o PSII foi afetado e os mecanismos de dissipação de luz começaram a operar. Ek e  
706 rETRmax diminuíram gradualmente começando em  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> enquanto  $\alpha$  em  
707  $4,7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre, confirmando que mesmo que o rendimento quântico  
708 máximo, efetivo e qP não respondessem ao cobre, a microalga foi afetada pelas baixas  
709 concentrações de cobre, próximas das ambientalmente relevantes.

710 O conteúdo intracelular absoluto de biomoléculas em *C. braunii* foi afetado em  
711  $4 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e acima, quando proteínas totais, carboidratos, lipídios, clorofila *a* e  
712 carotenóides (pg célula<sup>-1</sup>) aumentaram às custas das taxas de crescimento (d<sup>-1</sup>). O  
713 rendimento total de proteínas e lipídios (pg celular<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) aumentou em baixas  
714 concentrações de cobre livre,  $4,7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> para proteínas e  $2,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> para  
715 lipídios. No entanto, os pigmentos de clorofila *a* e os carotenóides não aumentaram com  
716 cobre extra.

717 Mostramos que, se fornecidos na quantidade correta, metais traços essenciais  
718 podem estimular a produtividade de certas biomoléculas, mas não outras, como os  
719 pigmentos. Assim, a manipulação bioquímica de microalgas usando cobre para  
720 desencadear a síntese de biomoléculas pode ser uma ferramenta promissora para aumentar  
721 o rendimento de biomoléculas de valor agregado. Além disso, os efeitos observados na  
722 composição bioquímica de *C. braunii*, mesmo em concentrações ambientais, podem  
723 interferir no balanço energético dos ecossistemas aquáticos, uma vez que as microalgas  
724 fazem parte da base das redes alimentares nesses ambientes.

725

726

727

- 729 ABALDE, J. et al. Response of the marine microalga [*Dunaliella tertiolecta*] (Chlorophyceae)  
730 to copper toxicity in short time experiments. **Bulletin of Environmental Contamination and**  
731 **Toxicology**, v. 54, p. 317–324, 1995.
- 732 AFKAR, E. A.; FATHI, A. A. Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris* , to Some  
733 Heavy Metals. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 6, n. 3, p. 230–237, 2010.
- 734 ALBALASMEH, A.A., BERHE, A.A. & GHEZZEHEI, T.A. A new method for rapid determination of  
735 carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.*  
736 97:253–61, 2013.
- 737 ASARE, M. L. et al. Heavy Metal Concentration in Water , Sediment and Fish Species in the  
738 Bontanga Reservoir , Ghana. **Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol.**, v. 10, p. 49–58, 2018.
- 739 BARON, M.; ARELLANO, J. B.; GORGÉ, J. L. Copper and Photosystem-ii - a Controversial  
740 Relationship. **Physiologia Plantarum**, v. 94, n. 1, p. 174–180, 1995.
- 741 BELSHE, E. F.; DURAKO, M. J.; BLUM, J. E. Photosynthetic rapid light curves (RLC) of *Thalassia*  
742 *testudinum* exhibit diurnal variation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.  
743 342, n. 2, p. 253–268, 2007.
- 744 BISHOP, W. M. et al. The Presence of Algae Mitigates the Toxicity of Copper-Based Algaecides  
745 to a Nontarget Organism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 2132–2142,  
746 2018.
- 747 BOSSUYT, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata*  
748 (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: Changes in tolerance and physiology.  
749 **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 1, p. 61–74, 2004.
- 750 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of  
751 protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p.  
752 248–254, 1976.
- 753 CHEN, Z. et al. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of  
754 photosynthesis and oxidant stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18,  
755 p. 17910–17918, 2016.
- 756 CHIA, M. A.; GALADIMA, S. Y.; JAPHET, W. S. Combined effect of atrazine and copper on the  
757 growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus*  
758 *quadricauda*. **Phycologia**, v. 54, n. 2, p. 109–117, 2015a.
- 759 CHIA, M. A.; GALADIMA, S. Y.; JAPHET, W. S. Combined effect of atrazine and copper on the  
760 growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus*  
761 *quadricauda*. **Phycologia**, v. 54, n. 2, p. 109–117, 2015b.
- 762 CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. D. G. G. Growth and biochemical composition of  
763 *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n.  
764 4, p. 1427–38, 2013.
- 765 CID, C. et al. Proteomic analysis of the response of an acidophilic strain of *Chlamydomonas* sp.  
766 (Chlorophyta) to natural metal-rich water. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 2026–2036, 2010.
- 767 CONTRERAS, L.; MOENNE, A.; CORREA, J. A. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria*

- 768 (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. **Journal of Phycology**, v. 41,  
769 n. 6, p. 1184–1195, 2005.
- 770 DE ABREU, F. C. P. et al. Effects of Cadmium and Copper Biosorption on *Chlorella vulgaris*.  
771 **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 4, p. 405–409, 2014.
- 772 DEWEZ, D. et al. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to  
773 evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. v. 74, p. 150–159,  
774 2005.
- 775 ECHEVESTE, P.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a  
776 cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.  
777 143, n. May, p. 228–235, 2017.
- 778 FÁBREGAS, J. et al. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga  
779 *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea.  
780 **Aquacultural Engineering**, v. 8, n. 4, p. 223–239, 1989.
- 781 FIGUEROA, F. L.; JEREZ, C. G.; KORBEE, N. Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate  
782 photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture  
783 systems. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 5, p. 801–819, 2013.
- 784 GARBAYO, I. et al. Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-  
785 resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). **Journal of Phycology**, v. 48,  
786 n. 3, p. 607–614, 2012.
- 787 GEORGOPOULOS, P. G. et al. ENVIRONMENTAL COPPER: ITS DYNAMICS AND HUMAN EXPOSURE  
788 ISSUES. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews**, v. 148, p.  
789 341–394, 2001.
- 790 GIBSON, C. E. Algicidal Effect of Copper on a Green and a Blue-Green-Alga and Some Ecological  
791 Implications. **Journal of Applied Ecology**, v. 9, n. 2, p. 513–518, 1972.
- 792 HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and  
793 advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.
- 794 ISMAIEL, M. M. S.; SAID, A. A. Tolerance of *Pseudochlorella pringsheimii* to Cd and Pb stress:  
795 Role of antioxidants and biochemical contents in metal detoxification. **Ecotoxicology and  
796 Environmental Safety**, v. 164, n. April, p. 704–712, 2018.
- 797 JAMERS, A. et al. Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas*  
798 *reinhardtii* based on microarray analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 80, n. 3, p. 249–260, 2006.
- 799 JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New Spectrophotometric Equations for determining  
800 Chlorophylls a, b, c and c in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. **Biochem. Physiol.  
801 Pflanzen**, p. 191–194, 1975.
- 802 JIANG, Y. et al. Towards elucidation of the toxic mechanism of copper on the model green alga  
803 *Chlamydomonas reinhardtii*. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 7, p. 1417–1425, 2016.
- 804 JUNEAU, P.; BERDEY, A. EL; POPOVIC, R. nvironmental Contamination and PAM Fluorometry in  
805 the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and  
806 *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper. v. 164, p. 155–164, 2002.
- 807 KALINOWSKA, R.; PAWLIK-SKOWROŃSKA, B. Response of two terrestrial green microalgae

- 808 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress.  
809 **Environmental Pollution**, v. 158, n. 8, p. 2778–2785, 2010.
- 810 KNAUER, KA.; BEHRA, RE.; SIGG, L. EFFECTS OF FREE CU<sup>2+</sup> AND ZN<sup>2+</sup> IONS ON GROWTH AND  
811 METAL ACCUMULATION IN FRESHWATER ALGAE. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.  
812 16, n. 2, p. 220–229, 1997.
- 813 KROMKAMP, J. C. et al. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The  
814 Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European**  
815 **Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 327–344, 2008.
- 816 KÜPPER, H. et al. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy  
817 metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 3, p. 429–441, 2002.
- 818 LI, M. et al. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme  
819 activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 565–  
820 572, 2006.
- 821 LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of  
822 *Phaeocystis cordata*. p. 77–87, 2011.
- 823 LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, L. A. MUCILAGINOUS CAPSULE ADSORPTION AND  
824 INTRACELLULAR UPTAKE OF COPPER BY *KIRCHNERIELLA APERTA* (CHLOROCOCCALES). **Journal**  
825 **of Phycology**, v. 337, n. August 2000, p. 332–337, 2002a.
- 826 LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, L. A. Mucilaginous capsule adsorption and  
827 intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v.  
828 38, n. 2, p. 332–337, 2002b.
- 829 LOMBARDI, A.; WANGERSKY, P. Influence of phosphorus and silicon on lipia class production by  
830 the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology**  
831 **Progress Series**, v. 77, n. 1987, p. 39–47, 1991.
- 832 MALDONADO, M. T. et al. Copper-dependent iron transport in coastal and oceanic diatoms.  
833 **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 4, p. 1729–1743, 2006.
- 834 MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of**  
835 **Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.
- 836 MIAO, A. J.; WANG, W. X.; JUNEAU, P. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine  
837 phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. **Environmental Toxicology and**  
838 **Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2603–2611, 2005.
- 839 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.
- 842 MULLER, P. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. **Plant**  
843 **Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1558–1566, 2001.
- 844 NRIAGU, J. O. Environment: Science and Policy for Sustainable Development. **Environment:**  
845 **Science and Policy for Sustainable Development**, v. 32, n. 7, p. 7–33, 1990.
- 846 PARRISH, C.C.,. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples.  
847 *Lipids Freshw. Ecosyst.* 4–20, 1999.

- 848 PEERS, G.; PRICE, N. M. Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an  
849 oceanic diatom. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 341–344, 2006.
- 850 PERALES-VELA, H. V.; GONZA, SERGIO; MONTES-HORCASITAS, C.; VILLANUEVA, R. O. Growth ,  
851 photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus*  
852 *incrassatulus* (Chlorophyceae). v. 67, p. 2274–2281, 2007.
- 853 PLATT, T., GALLEGOS, C. L. HARRISON, W. G. (1980). Photoinhibition of photosynthesis in  
854 natural assemblages of marine phytoplankton. *J. mar Res.* 38: 687-701
- 855 PRASAD, M.N.V. and HAGEMeyer, J. (1999) Heavy Metal Stress in Plants—From Molecules to  
856 Ecosystems. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 401. 858  
857 <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0>
- 858 QIAN, H. et al. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and  
859 photosynthesis-related gene transcription. v. 94, p. 56–61, 2009.
- 860 QIAN, Z. J. et al. In vitro antioxidant activities of the fermented marine microalga *pavlova lutheri*  
861 (haptophyta) with the yeast *hansenula polymorpha*. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 2, p. 475–  
862 482, 2012.
- 863 RALPH, P. J. et al. Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants  
864 and pollution in aquatic systems: Review. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 89, n.  
865 4, p. 589–607, 2007.
- 866 RAUSCH, T. <<The >>estimation of micro- algal protein content and its meaning to the evaluation  
867 of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. **Hydrobiologia**, v. 78(3), n. 3,  
868 p. 237–251, 1981.
- 869 RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron  
870 transport in O<sub>2</sub> evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, n. 2–3, p. 111–149, 1999.
- 871 REN, H. Y. et al. Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions  
872 and EDTA addition. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 763–767, 2014.
- 873 REYNOLDS, C. S. The Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press. ISBN:  
874 9780521605199. 552 p. 2006.
- 875 RIPPKA, R.; DEURELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STAINER, R.Y. Generic  
876 assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen.*  
877 *Microbiol.* 111: 1 - 61, 1979.
- 878 ROCHA, G. S. et al. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum*  
879 *gracile* (Reinsch). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 8, p. 1468–1477, 2016.
- 880 RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using  
881 agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, n. PB, p. 144–148, 2014.
- 882 SABATINI, S. E. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed  
883 to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 4, p. 1200–1206, 2009.
- 884 SAKSHAUG, E. et al. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of  
885 results. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 11, p. 1637–1670, 1997.
- 886 SANDMANN, G.; BÖGER, P. Copper Deficiency and Toxicity in *Scenedesmus*. **Zeitschrift für**  
887 **Pflanzenphysiologie**, v. 98, n. 1, p. 53–59, 1980.

888 SANKARAN, R. et al. Exploitation and Biorefinery of Microalgae. In: **Waste Biorefinery**. [s.l.]  
889 Elsevier B.V., 2018. p. 571–601.

890 SCHREIBER, U. et al. Assessment of photosynthetic performance of Prochloron in Lissoclinum  
891 patella in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. **Plant and Cell Physiology**, v. 38,  
892 n. 8, p. 945–951, 1997.

893 SCHREIBER, U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method:  
894 An Overview. In: **Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**. [s.l.: s.n.]. p. 279–  
895 319.

896 SHOAF, W. T.; LIUM, B. W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl  
897 sulfoxide. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 6, p. 1973–1975, 1976.

898 SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under  
899 copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, n. January, p. 57–63, 2018.

900 SUNDA, W. G.; HUNTSMAN, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and  
901 physiological effects: Phytoplankton as model systems. **Science of the Total Environment**, v.  
902 219, n. 2–3, p. 165–181, 1998.

903 TONIETTO, A. E. et al. Chemical behavior of Cu , Zn , Cd , and Pb in a eutrophic reservoir :  
904 speciation and complexation capacity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p.  
905 15920–15930, 2015.

906 TONIETTO, A. E.; GRASSI, M. T. Speciation analysis of copper and zinc using differential pulse  
907 anodic stripping voltammetry. **Química Nova**, v. 35, n. January 2012, p. 170–174, 2012.

908 TRISSL, H.W., LAVERGNE J. Fluorescence Induction From Photosystem II: Analytical Equations for  
909 the Yields of Photochemistry and Fluorescence Derived From Analysis of a Model Including  
910 Exciton-Radical Pair Equilibrium and Restricted Energy Transfer Between Photosynthetic Units .  
911 *Functional Plant Biology* 22, 183-193, 1995.

912 WANG, H.; SATHASIVAM, R.; KI, J. S. Physiological effects of copper on the freshwater alga  
913 *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae) and its potential use in toxicity  
914 assessments. **Algae**, v. 32, n. 2, p. 131–137, 2017.

915 WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total  
916 Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal**  
917 **of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

918 YONG, W. K. et al. Interactive effects of temperature and copper toxicity on photosynthetic  
919 efficiency and metabolic plasticity in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). **Journal of**  
920 **Applied Phycology**, p. 1–13, 2018.

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

923