

**Universidade Federal de São Carlos Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde**

Rafael Vinícius de Oliveira

**Concentrações ambientais de cobre induzem ao acúmulo de biomoléculas em
*Ankistrodesmus fusiformis***

São Carlos 2023

**Universidade Federal de São Carlos Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde**

Rafael Vinícius de Oliveira

**Concentrações ambientais de cobre induzem ao acúmulo de biomoléculas em
*Ankistrodesmus fusiformis***

Trabalho de conclusão de curso submetido como
requisito para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia

Orientador: Prof^ª. Dra. Ana Teresa Lombardi

São Carlos 2023

Dedicado aos meus pais José e Mônica, a minha irmã Natália e a minha namorada Giulia, por todo apoio, suporte e amor.

Agradecimentos

Começo meus agradecimentos aos meus pais José e Mônica. Sem eles, nunca teria a oportunidade de cursar uma universidade pública. Agradeço por todo o apoio e suporte. Com certeza, vocês são uma das pessoas mais importantes a quem quero dedicar esse trabalho.

Agradeço à minha irmã Natália por sempre me ajudar e apoiar, ficando feliz pelas minhas conquistas e aconselhando-me sobre as mais diversas situações da vida.

Agradeço à minha namorada Giulia por tornar os momentos mais complicados, como a pandemia, mais leves. Agradeço por me ajudar e sempre estar ao meu lado, assim como a sua família que me acolheram da melhor forma possível.

Quero agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi, pela oportunidade, disposição em ajudar, compreensão e vontade em fazer dar certo, mesmo durante um momento tão atípico como foi a pandemia. Agradeço pelo exemplo e pela inspiração na área da pesquisa e como pessoa.

Aos meus amigos, agradeço por tornarem as noites viradas de estudo mais divertidas e me ensinarem muitas coisas durante esse período morando tão distante em outra cidade. Em especial, agradeço aos meus amigos Pedro, Junior e Matheus, por sempre estarem por perto e me ajudarem com tudo. Aos meus colegas de laboratório que agora são muito mais do que isso, meus amigos Douglas e Jaqueline, obrigado por sempre me auxiliarem no laboratório, pelos conselhos e por terem sido pessoas incríveis nessa jornada.

Agradeço ao Dr. Suleiman Dauda por todo suporte e ensinamentos durante esse tempo no laboratório.

Agradeço a todas as pessoas que passaram em minha vida durante essa trajetória por todos os ensinamentos e dedico meu trabalho a todos vocês! Sem vocês, isso não teria sido possível. Por isso, serei eternamente grato!

Resumo

As microalgas são importantes organismos fotossintetizantes e desempenham um papel fundamental sendo a base da cadeia alimentar. Além disso, elas também são umas das principais formas de entrada de nutrientes e outras substâncias, como metais pesados, aos níveis tróficos superiores. Atualmente, o interesse pelas microalgas vem aumentando pelo seu potencial biotecnológico, produzindo moléculas valiosas em áreas como farmacologia, alimentação, aquicultura e agricultura. Devido à sua plasticidade fisiológica, as microalgas são capazes de sintetizar compostos que as protegem contra alterações ambientais. Estudos recentes mostram que doses baixas de cobre podem aumentar a produtividade de biomoléculas em algumas espécies de microalgas. Este projeto, teve como objetivo determinar as concentrações de cobre capazes de induzir a síntese de biomoléculas na espécie *Ankistrodesmus fusiformis*. Usando ferramentas da ecotoxicologia, calculamos as concentrações EC10 - EC50 com base na densidade populacional e viabilidade celular, bem como analisamos a taxa de crescimento, concentração intracelular de proteínas, lipídios, carboidratos totais, carotenóides e conteúdo de clorofila, juntamente com o potencial antioxidante (método DPPH). Observamos um efeito estimulante nas concentrações intermediárias de cobre, porém no tratamento com a concentração mais elevada do metal um efeito tóxico foi observado. Esse estudo contribui para uma melhor compreensão dos efeitos do cobre na fisiologia das microalgas, além de oferecer possíveis estratégias para aumentar a produção de biomoléculas, o que é importante para as áreas de biologia e biotecnologia.

Palavras-chave: microalgas, ecofisiologia, biomoléculas, toxicidade.

Lista de figuras

Figura 1. Fluxograma de desenvolvimento e etapas laboratoriais.

Figura 2. Taxa de crescimento em função do tempo experimental do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 3. Carboidratos totais após 72 h de cultivo da *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 4. Proteínas totais após 72 h de cultivo da *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 5. Razão entre Proteínas e Carboidratos totais do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 6. Lipídios totais após 72 h de cultivo da *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 7. Razão entre Clorofila *a* e carotenoides totais em 72 h do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 8. Porcentagem de atividade antioxidante em 72 h do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. A concentração mais elevada do metal cobre de $7,8 \times 10^{-8} \text{ Cu}^{+2} \text{ mol}^{-1}$ não teve atividade antioxidante detectada (ND: Não detectado). Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 9. Valores do parâmetro de fluorescência quenching fotoquímico (qP) em fase exponencial do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 10. Valores do parâmetro de fluorescência quenching não fotoquímico (NPQ) em fase exponencial do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 11. Valores da eficiência de absorção de luz do fotossistema II (α) obtidos após o ajuste RLC, de acordo com Platt et al. (1980), do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 12. Valores da taxa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) obtidos após o ajuste RLC, de acordo com Platt et al. (1980), do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Figura 13. Valores da irradiância de saturação da fotossíntese (E_k) obtidos após o ajuste RLC, de acordo com Platt et al. (1980), do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

Lista de tabelas

Tabela 1. Concentrações de cobre às quais culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* foram expostas. Valores em mol.L⁻¹.

Tabela 2. Resultados de clorofila *a*, clorofilas totais, carotenoides e a razão clorofila *a*/carotenóides. Letras sobrescritas representam os tratamentos que tiveram diferenças significativas entre si (ANOVA p<0,05).

Lista de anexos

Anexo 1. Curvas rápidas de luz (RLC) na fase exponencial do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre.

Anexo 2. Curva de crescimento (Ln de densidade celular [cel.mL⁻¹]) em função do tempo experimental da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre.

Anexo 3. Fluorescência (Ln de unidades relativas de fluorescência [RFU]) em função do tempo experimental da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre.

Tabela de Conteúdo

1. Introdução	10
2. Objetivos	11
2.1. Objetivos específicos	11
3. Materiais e métodos	12
3.1. Condições de cultivo	12
3.2. Manipulação bioquímica	12
3.3. Determinação dos íons cobre livre (Cu ²⁺)	13
3.4. Monitoramento dos cultivos	13
3.5. Determinações bioquímicas	14
3.6. Parâmetros fotossintéticos	15
3.7. Resposta Antioxidante	15
3.8. Experimentos de exposição ao cobre	15
3.9. Análise dos dados	16
4. Resultados e discussão	16
4.1. Taxa de crescimento	16
4.2. Carboidratos totais	17
4.3. Proteínas totais	18
4.4. Razão Proteínas/Carboidratos	19
4.5. Lipídios	20
4.6. Biomassa seca, Clorofila α , Clorofilas totais e Carotenoides	21
4.7. Razão Clorofila a /Carotenoides	22
4.8. Atividade antioxidante (DPPH)	23
4.9. Parâmetros fotossintéticos	23
4.9.1 Parâmetros fotossintéticos e síntese de pigmentos	24
5. Considerações finais	27
6. Referências	28
7. Anexos	31

1. Introdução

Por se tratar de um microrganismo fotossintetizante e conseqüentemente um produtor primário, as microalgas são uma das principais maneiras de entrada de metais, nutrientes e outras substâncias na cadeia alimentar. Logo, realizar estudos para compreensão de como essas substâncias podem afetar a fisiologia das microalgas, tanto com relação ao estímulo na síntese de biomoléculas, quanto aos possíveis impactos ambientais que podem causar, são importantes (Yaakob et al. 2014; Purbonegoro et al. 2018). Sendo sensíveis a alterações no ambiente aquático, as microalgas podem ser afetadas por mudanças no ambiente em que se encontram, o que pode ocasionar um grande impacto ambiental (Levy et al. 2007). No entanto, por terem uma capacidade de adaptação às alterações no meio e diversas aplicações como indicadores de poluição, aditivos alimentares, tratamentos de efluentes, produção de enzimas com potencial biotecnológico e a síntese de moléculas com alto valor agregado, o interesse pelas microalgas vem crescendo (Camacho et al. 2019; Monteiro et al. 2012; Yaakob et al. 2014).

Para o seu desenvolvimento, as microalgas precisam de metais nutrientes. Contudo quando esses metais estão em concentrações acima das normalmente requeridas eles se tornam tóxicos para o organismo (Huntsman 1980; Pistocchi et al. 1997). Como as ações antrópicas são uma das principais fontes de metais pesados no meio em que as populações de microalgas vivem, estudos relacionados às alterações metabólicas desses organismos, ocasionados por esses metais são de extrema importância. Acredita-se que a concentração desses metais tende a aumentar com o tempo no meio ambiente, uma vez que elementos metálicos não são biodegradáveis e são utilizados em diversas atividades industriais (Monteiro et al. 2012). A captura desses metais pelas microalgas gera acúmulo dessas substâncias nos organismos, nos diferentes níveis tróficos (Kondzior e Butarewicz 2018; Masindi e Muedi 2018). Neste projeto, em particular, o cobre foi o metal traço estudado.

Existem muitos estudos sobre a interação entre o metal cobre e as microalgas, com o objetivo de investigar a fisiologia, os impactos e outros efeitos desse metal nesses organismos. Um desses estudos foi realizado em um rio na Argentina, onde se observou que o cobre causou efeitos prejudiciais nas diferentes espécies de microalgas, incluindo a espécie *Ankistrodesmus fusiformis*, a qual foi objeto de estudo deste projeto (Magdaleno et al. 2014). Ainda sobre o estudo de Magdaleno et al. (2014), foram obtidos dados que comprovaram a diminuição da população das microalgas com a variação da concentração do cobre. Já as pesquisas realizadas por Kondzior e Butarewicz (2018) revelaram alterações na concentração das biomoléculas produzidas pelas microalgas em diferentes concentrações de cobre. Constatou-se variação de carotenóides e clorofilas, com diminuição dessas biomoléculas em certas concentrações de cobre. Ademais, foi mostrado pelos autores a capacidade das microalgas em acumular certa quantidade do metal (Kondzior e Butarewicz 2018).

Sendo organismos de fácil cultivo e com uma grande diversidade, as microalgas estão sendo cada vez mais valorizadas pelas indústrias, como as alimentícias, farmacêuticas e biotecnológicas. Tal

importância deve-se ao potencial dessas microalgas em produzir compostos de interesse com alto valor agregado (Olaizola 2003). Biomoléculas como carotenoides, polissacarídeos, ácidos graxos poliinsaturados, além de proteínas, dentre outros compostos ativos podem ser isolados das microalgas. No entanto, uma questão a ser superada relacionada a esse organismo é o alto custo para seu cultivo. Assim, compreender como produzir uma maior quantidade de biomoléculas a partir da alteração do meio, como ajustes na concentração de elementos nutritivos, é de interesse para o mercado.

Considerando que mudanças nas condições físico-químicas afetam a fisiologia das microalgas, e conseqüentemente, sua produção de biomoléculas, pode-se concluir que o controle do meio é uma ferramenta valiosa para manipular a quantidade de biomoléculas de interesse. Embora os estudos sobre o cobre sejam abundantes, a maioria se concentra na toxicidade do metal, e não em seu efeito na produção de biomoléculas. Este projeto é inovador ao estudar os efeitos do cobre em ambientes controlados para aumentar a produção de biomoléculas de potencial biotecnológico em uma população específica de microalgas. Essa abordagem é essencial para reduzir os custos de produção algal, uma vez que será possível produzir uma quantidade maior de biomoléculas por unidade de massa algal.

A partir dos resultados de diversos estudos citados anteriormente, pode-se observar variações bioquímica e populacional das microalgas, quando expostas a determinadas concentrações de metais no meio, incluindo o cobre. Com isso, o objetivo deste projeto foi encontrar uma concentração de cobre que aumentasse a produção de biomoléculas de interesse, sem que o organismo tivesse a sua taxa de crescimento afetada.

2. Objetivos

O objetivo do projeto foi definir e analisar em quais concentrações de cobre haveria acúmulo de biomoléculas na microalga *Ankistrodesmus fusiformis*. Estudamos sua fisiologia sob condições controladas e, além de biomoléculas, analisamos o crescimento populacional e a fotossíntese.

2.1. Objetivos específicos

- Encontrar pelo menos uma concentração de cobre capaz de levar ao aumento de biomoléculas, dentre os lipídios, carboidratos, proteínas e carotenoides, sem redução da taxa de crescimento;
- Analisar a *Ankistrodesmus fusiformis* em condições de estresse fisiológico causado pelo cobre, observando a fotossíntese e o comportamento da cultura.

3. Materiais e métodos

A figura 1, apresentada a seguir, mostra um fluxograma do projeto, com as etapas laboratoriais e análises que foram realizadas.

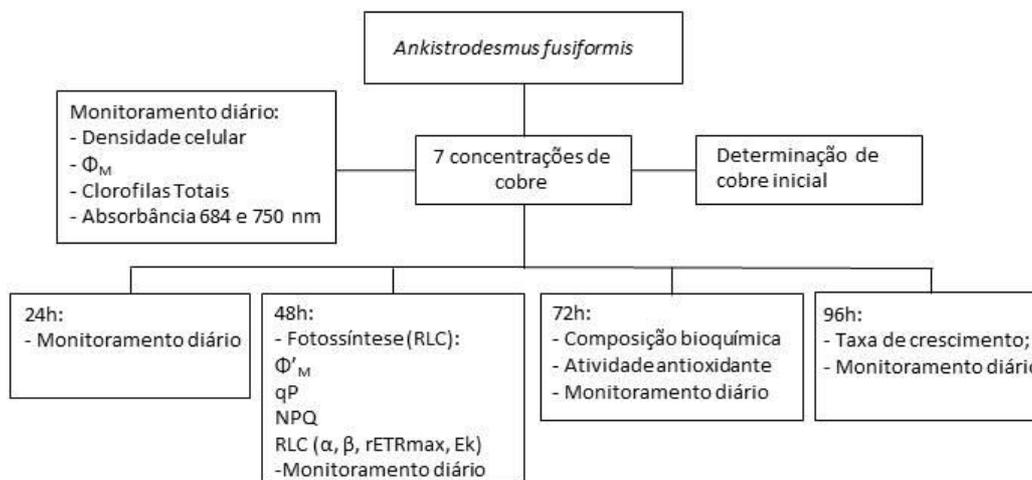


Figura 1. Fluxograma de desenvolvimento e etapas laboratoriais.

3.1. Condições de cultivo

A microalga *Ankistrodesmus fusiformis* foi cultivada em meio BG11 com pH 7.0 (Rippka et al. 1979) esterilizado em autoclave (20 min, 121 °C, 1 bar; Phoenix Luferco, Brasil) e mantida sob condições controladas de temperatura (24 °C \pm 1) e intensidade luminosa (200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.2. Manipulação bioqu\u00edmica

Ankistrodesmus fusiformis foi exposta a 7 concentra\u00e7\u00f5es de cobre (Tabela 1) para que fosse determinada a concentra\u00e7\u00e3o onde ocorresse aumento da biomassa (poss\u00edvel efeito hormese) e, simultaneamente, dos bioprodutos de interesse. Para definir essas 7 concentra\u00e7\u00f5es realizamos um experimento preliminar com cobre para termos certeza de que a taxa de crescimento populacional n\u00e3o seria bruscamente afetada. Desse experimento preliminar, definiu-se a concentra\u00e7\u00e3o nominal de cobre de $6,86 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, que ocasionou 15% de redu\u00e7\u00e3o no crescimento populacional (EC15). Tendo este valor como base, escolhemos as demais concentra\u00e7\u00f5es nominais para o experimento, que s\u00e3o mostradas na tabela 1 e prosseguiu-se \u00e0s culturas. Em nosso experimento analisamos se o crescimento era mantido pr\u00f3ximo ou superior ao do controle ($1,32 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ de Cu^{2+}) e com uma maior quantidade de biomol\u00e9culas devido ao est\u00edmulo qu\u00edmico.

Tabela 1. Concentrações de cobre às quais culturas de Ankistrodesmus fusiformis foram expostas. Valores em mol.L⁻¹.

Cobre nominal	Cobre livre
0,8 x 10 ⁻⁷	1,3 x 10 ⁻¹⁰
1,8 x 10 ⁻⁷	5,8 x 10 ⁻⁹
2,2 x 10 ⁻⁷	6,9 x 10 ⁻⁹
2,8 x 10 ⁻⁷	7,4 x 10 ⁻⁹
3,2 x 10 ⁻⁷	1,0 x 10 ⁻⁸
6,0 x 10 ⁻⁷	1,9 x 10 ⁻⁸
5,0 x 10 ⁻⁶	7,8 x 10 ⁻⁸

3.3. Determinação dos íons cobre livre (Cu²⁺)

Os íons de cobre livre foram determinados a partir de procedimentos descritos em Lombardi et al. (2007). Tal método baseia-se no uso de eletrodo seletivo de íons cobre (ISE-Cu), o qual é calibrado com o uso de tampões metálicos. Um eletrodo seletivo de cobre (ISE-Cu) foi utilizado como eletrodo de trabalho (Thermo Scientific Orion 9429BN) e a temperatura mantida em 23 ± 2 °C. Para ampliar o limite de detecção do ISE-Cu, utilizamos um tampão metálico de cobre com borato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido nitrilotriacético (Sigma-Aldrich, Alemanha), nitrato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha), e padrão de cobre (38996 Sigma-Aldrich, EUA) na composição. Para tanto, seguiu-se o protocolo descrito em Lombardi et al. (2007).

3.4. Monitoramento dos cultivos

Densidade celular: Para determinação da biomassa foram coletados 5 mL de amostra e feito o monitoramento da cultura diariamente (contagem de células). As células foram contadas em um citômetro de fluxo MUSE (Millipore, USA).

Taxa de Crescimento: A taxa de crescimento foi obtida a partir de uma regressão linear, onde o logaritmo natural da densidade celular foi plotado em função do tempo experimental em dias, a partir da qual o coeficiente angular é considerado uma representação da taxa de crescimento populacional (Andersen 2005).

Biomassa seca: A biomassa seca foi determinada gravimetricamente após 72 h de cultivo, quando a microalga ainda se encontrava em fase exponencial de crescimento. Para isso, amostras de 5 mL das

culturas foram filtradas em membranas de acetato de celulose previamente secas e mantidas em estufa a 40 °C. Após filtragem, os filtros foram secos a 38 °C por 24 h e sua massa aferida na balança microanalítica (Mettler Toledo – capacidade 10⁻⁶ g).

EC15: O EC15 representa a concentração de uma determinada substância, neste caso o cobre, que leva a efeitos adversos em 15% da população de microalgas. A partir de um pré-experimento realizado com uma microalga do gênero *Ankistrodemus*, determinamos o EC15 e escolhemos 7 concentrações de cobre menores do que o EC15 para prosseguirmos ao experimento de manipulação bioquímica da cepa.

3.5. Determinações bioquímicas

Após 72 h de cultivo foram determinados carboidratos, lipídios, e proteínas totais. Para isso, amostras para carboidratos (10 mL), lipídios (100 mL), e proteínas (50 mL) foram centrifugadas por 15 min (4400 rpm) em centrífuga refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, EUA). A biomassa sedimentada foi armazenada em -80°C para posterior análise.

Carboidratos: A determinação de carboidratos totais foi realizada de acordo com o procedimento descrito em Albalasmeh et al (2013), que se baseia na hidrólise dos carboidratos da amostra usando ácido clorídrico, seguido por ajuste de pH e adição de fenol e ácido sulfúrico. É realizada a leitura na absorvância de 490 nm para determinar a quantidade de carboidratos na amostra. Para esta análise, 10 mL de amostra foi filtrada.

Proteínas: A concentração de proteínas totais intracelulares foi realizada a partir do método de Lowry (1951), o qual tem como princípio o uso do reagente FolinCiocalteau. Este sofre redução na presença do catalisador Cu²⁺, e foi realizado como descrito em Slocombe et al. (2013). A extração de proteínas também foi feita de acordo com Slocombe et al. (2013).

Lipídios: Para a determinação da concentração de lipídios totais foram coletados 100 mL de amostra após 72 h e filtradas em filtros de fibra de vidro. Os filtros foram armazenados em 2 mL de clorofórmio e colocados no ultrafreezer (- 80 °C) até que as análises fossem realizadas como descrito em Parrish (1999).

Clorofila a e carotenoides: As concentrações de clorofila *a* e carotenoides em 5 mL de amostra foram determinadas de acordo com Wellburn (1994). Para tanto fez-se extração dos pigmentos com DMSO e absorvância nos comprimentos de onda 665 nm – clorofila *a*, e 649 nm – carotenoides. Para o cálculo dos pigmentos, usamos a equação descrita em Wellburn (1994).

3.6. Parâmetros fotossintéticos

Foi utilizado o fluorímetro com pulsos de luz de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz, Alemanha), para a determinação dos parâmetros fotossintéticos. As amostras das culturas eram coletadas diariamente, aclimatizadas por 20 minutos, fazendo com que o fotossistema II ficasse completamente oxidado. Então, as amostras eram submetidas à análises e a partir dos valores obtidos com o PHYTO-PAM-I, determinou-se os valores do rendimento quântico fotossintético máximo (Φ_M), de acordo com Lombardi e Maldonado (2011). Os valores do rendimento quântico efetivo (Φ'_M), *quenching* fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ), foram determinados segundo as equações descritas em Juneau et al. (2002). A seguir apresenta-se as equações que foram utilizadas para os cálculos.

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

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

$$qP = (F'_M - F'_S) / (F'_M - F'_0) \quad (3)$$

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

Os valores de α (coeficiente de absorção de luz), ETRmax (taxa máxima de transporte de elétrons) e E_k (ponto de saturação luminosa), foram obtidos a partir de uma curva de resposta da fotossíntese em função da intensidade de luz, obtida da curva rápida de luz (RLC), que é uma técnica utilizada para avaliar a eficiência fotossintética. Então, a partir de um ajuste a RLC segundo Platt et al. (1980), determinamos com o software Igor Pro os valores de α , ETRmax e E_k .

3.7. Resposta Antioxidante

DPPH: Para determinação da atividade antioxidante, após 72 horas de cultivo, foram retirados 300 mL de amostra. Então, foi realizada a centrifugação, retirada do sobrenadante e liofilização da amostra. As amostras foram pesadas e a extração foi realizada com etanol 70%, juntamente com pequenas esferas de vidro e a agitação do vortex por 3 minutos. Após a extração, o sobrenadante foi coletado e utilizado para quantificação do DPPH, segundo Pires et al. (2017). Por fim, as amostras foram lidas no espectrofotômetro (517 nm) e o conteúdo de DPPH foi calculado seguindo a curva de calibração com BHT (hidroxitolueno butilado).

3.8. Experimentos de exposição ao cobre

As sete concentrações de cobre foram escolhidas com base em experimento preliminar e seus valores são mostrados na Tabela 1. O metal cobre foi adicionado nos frascos de cultura de poliestireno e deixado 24 h para equilíbrio químico do metal. Após esse período, as células foram inoculadas em concentração de $\approx 4,28 \times 10^4$ cél.mL⁻¹.

O cultivo foi realizado por 96 horas, com amostragem diária em 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Diariamente foram coletados 5 mL de amostra de cada triplicata para análise, sendo elas: contagem de células realizadas no MUSE (Millipore, USA), rendimento máximo (PhytoPAM – Walz, Alemanha), clorofilas totais (fluorímetro) e o absorvância em espectrofotômetro (684 e 750 nm). Além disso, nas primeiras 24 h foram retirados 20 mL de cada meio e preparados para posterior determinação da concentração inicial de cobre livre. Após 48 horas, foram realizadas as determinações de rendimento efetivo e curva rápida de luz. Todos os tratamentos foram realizados com 3 réplicas experimentais.

3.9. Análise dos dados

Os resultados foram analisados por ANOVA One-Way e são apresentados nas figuras como média e desvio padrão de 3 réplicas experimentais. As figuras foram feitas no software estatístico R e Igor Pro (curva de luz).

4. Resultados e discussão

4.1. Taxa de crescimento

As curvas de crescimento, a partir das quais foram calculadas as taxas de crescimento para todos os tratamentos, são mostradas no anexo 2. A taxa de crescimento obtida em 96 h de cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* (figura 2) mostraram uma diferença significativa entre as concentrações de $7,4 \times 10^{-9}$, $1,9 \times 10^{-8}$ e $7,8 \times 10^{-8}$ (mol.L⁻¹) de cobre livre quando comparadas entre si (ANOVA p<0,05). Além disso, a concentração mais alta de cobre livre $7,8 \times 10^{-8}$ (mol.L⁻¹) diferenciou-se significativamente de todos os tratamentos (ANOVA p<0,05), ocorrendo uma redução alta na taxa de crescimento das microalgas. Ainda que, no experimento preliminar, essa concentração não tenha afetado tão drasticamente a taxa de crescimento.

Desde que esteja em quantidades adequadas, por se tratar de um micronutriente essencial para a microalga, o cobre pode estimular o crescimento e produção de determinadas moléculas nas microalgas (Lim et al. 2006), como é possível observar na concentração de $7,4 \times 10^{-9}$. Contudo, quando essas concentrações estão acima das requeridas, esse metal nutriente passa a ser tóxico e até mesmo nocivo para as algas (Cid et al. 1995; Lombardi e Maldonado 2011). Os resultados que obtivemos em relação à taxa de crescimento sugere que o meio BG-11, o qual corresponde à concentração de $1,3 \times 10^{-10}$ mol.L⁻¹ de cobre livre, tem uma quantidade de cobre inferior à requerida para o crescimento ideal da microalga *Ankistrodesmus fusiformis*. Isso justifica o maior crescimento da microalga em concentrações do metal que estão ligeiramente acima do controle.

É possível notar que na concentração de $7,8 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺, ocorreu uma queda na taxa de crescimento da microalga. Esse efeito decorre do cobre estar presente em quantidade acima da necessária, passando a ser tóxico para o organismo. Em excesso o cobre pode levar à depleção de ATP

pela inibição de enzimas, bem como outras alterações metabólicas e fisiológicas nas microalgas (Guanzon et al.1994, Afkar et al. 2010).

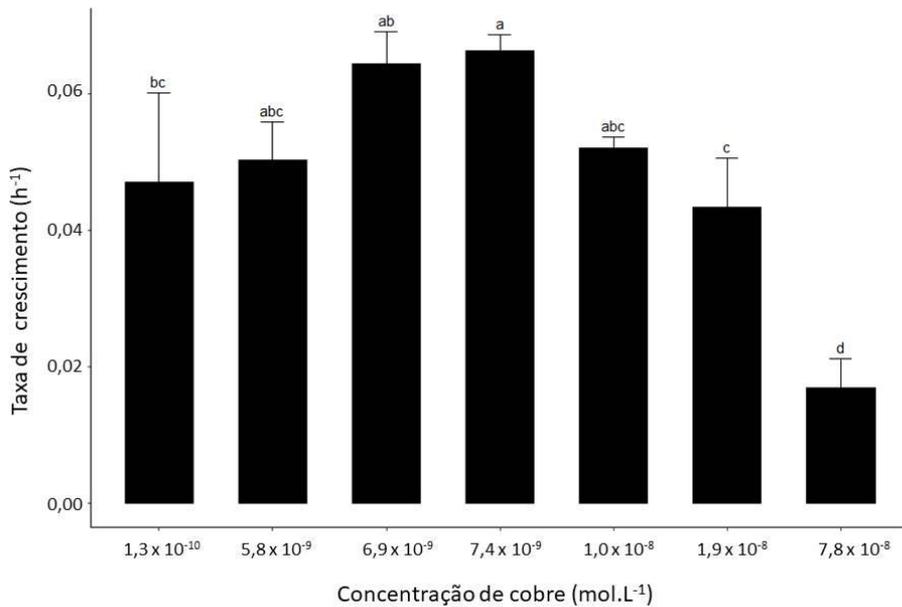


Figura 2. Taxa de crescimento em função do tempo experimental do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

4.2 Carboidratos totais

A figura 3 mostra a concentração de carboidratos em células de *A. fusiformis* em 72 horas de cultivo quando expostas às diferentes concentrações de cobre.

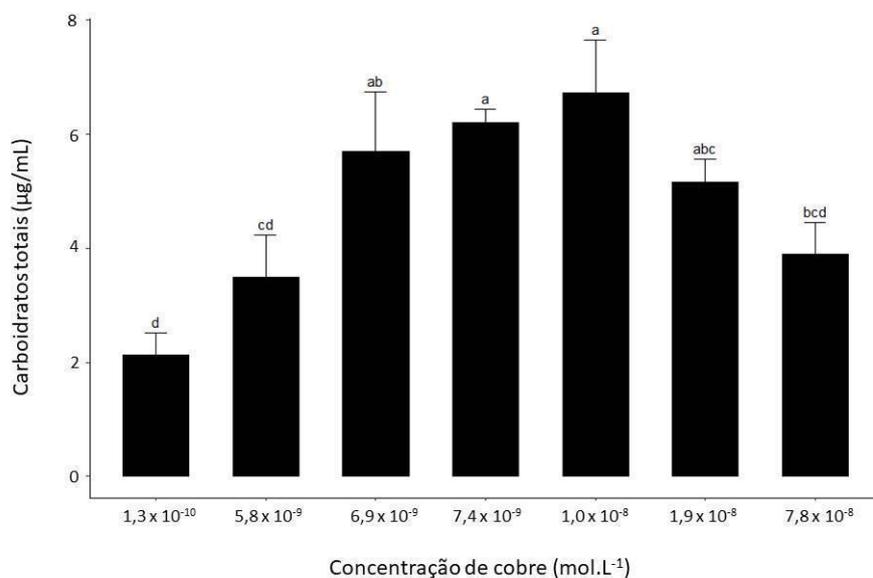


Figura 3. Carboidratos totais após 72 h de cultivo da *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

Os resultados mostraram um aumento significativo (ANOVA $p < 0,05$) nos tratamentos com $6,9 \times 10^{-9}$ - $1,9 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ de Cu²⁺ em comparação às concentrações mais baixas e à concentração mais elevada do metal. Uma das razões para o aumento de carboidratos nas concentrações de cobre maiores do que o controle, pode ser o estresse de baixa intensidade induzido pelo metal, que pode ter levado a uma maior síntese da molécula. O acúmulo de carboidratos em microalgas sob situação de estresse é relatado na literatura (Silva et al. 2015; Baracho et al. 2019). A crescente produção de carboidratos quando as microalgas se encontram em situações adversas, como por exemplo o aumento da concentração de cobre no meio, pode ocorrer dada à capacidade dos carboidratos de realizarem ligações com o metal, diminuindo sua biodisponibilidade e, conseqüentemente resultando em menos danos ao organismo (Afkar et al. 2010). Ademais, os carboidratos são moléculas energéticas, podendo se acumular nas microalgas quando em situações de estresse (Jaiswal et al. 2020)

4.3. Proteínas totais

A figura 4 mostra o rendimento de proteínas. Observamos uma diferença significativa entre o controle e os tratamentos com $6,9 \times 10^{-9}$ e $7,4 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹ de cobre livre (ANOVA $p < 0,05$), tratamentos com as maiores concentrações de proteínas. Esse aumento pode ser atribuído às proteínas ligadoras de metais produzidas pela microalga quando exposta ao metal. De acordo com a literatura, essa pode ser uma estratégia para prevenir danos fisiológicos causados pelo cobre, que por sua vez podem ser ocasionados por aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sabatini et al. 2009). Pelo fato da maior concentração de proteínas ter ocorrido em concentrações intermediárias do cobre, sugerimos que tenha sido uma ação de estímulo e não de estresse, já que um aumento na síntese de proteínas ocasionado por estresse, levaria a um aumento da concentração de proteínas nos tratamentos com uma maior concentração de cobre, porém isso não aconteceu.

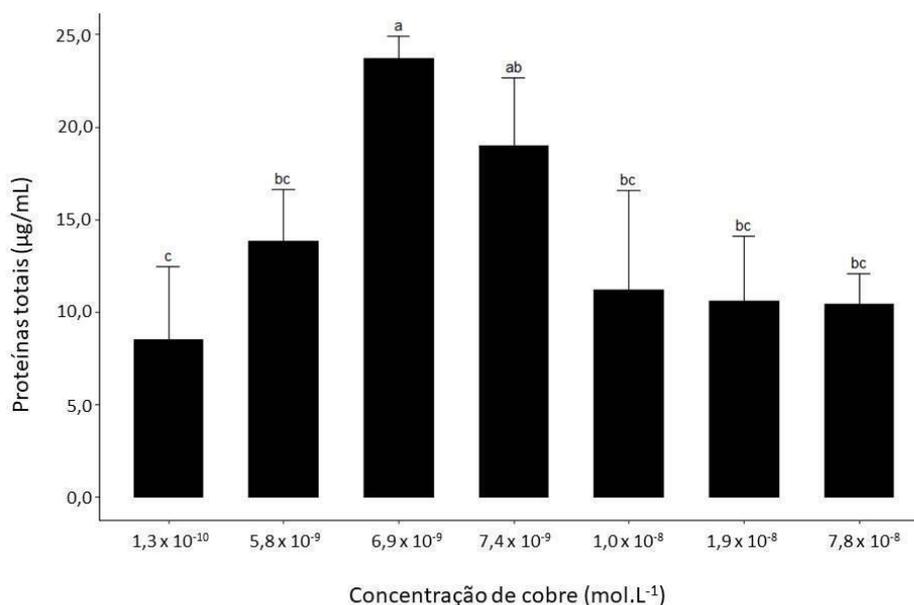


Figura 4. Proteínas totais após 72 h de cultivo da *Anastrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

4.4. Razão Proteínas/Carboidratos

A figura 5 apresenta os resultados da razão entre Proteínas e Carboidratos, sem diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA $p > 0,05$). A razão Proteínas/Carboidratos é uma forma de determinar o estado geral das células da cultura, mostrando as condições fisiológicas em que se encontra o cultivo (Ganf et al. 1986; Silva 2022). Ao avaliar os resultados, é evidente que a variação de proteínas e carboidratos não ocorreu de maneira proporcional, ou seja, o aumento e/ou diminuição de uma das duas biomoléculas, não é acompanhado pelo aumento e/ou diminuição da outra biomolécula. Isso pode ser observado quando comparadas as figura 3 e a figura 4, com alta produção de carboidratos na concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺ livre, enquanto nessa mesma concentração a produção de proteínas foi menor comparada com os tratamentos $6,9 \times 10^{-9}$ e $7,4 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺ livre. Portanto, a variação de proteínas e carboidratos não é proporcional à variação das concentrações do metal. Além disso, mesmo não tendo uma diferença significativa na razão P/C, ao analisarmos os gráficos de cada biomolécula separadamente, podemos ver que houve uma maior síntese de proteínas e carboidratos em algumas das concentrações intermediárias, com destaque para as concentrações de $6,9 \times 10^{-9}$ e $7,4 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺ livre. Isso levou a uma razão P/C similar aos outros tratamentos. No entanto, esse valor está associado a um aumento da produção de carboidratos e na síntese de proteínas nessas duas concentrações, enquanto nos outros tratamentos, o motivo da razão P/C ter se mantido próxima às demais está associada a uma menor concentração de carboidratos e de proteínas como podemos observar nas concentrações de $1,3 \times 10^{-9}$ e $7,8 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺ livre.

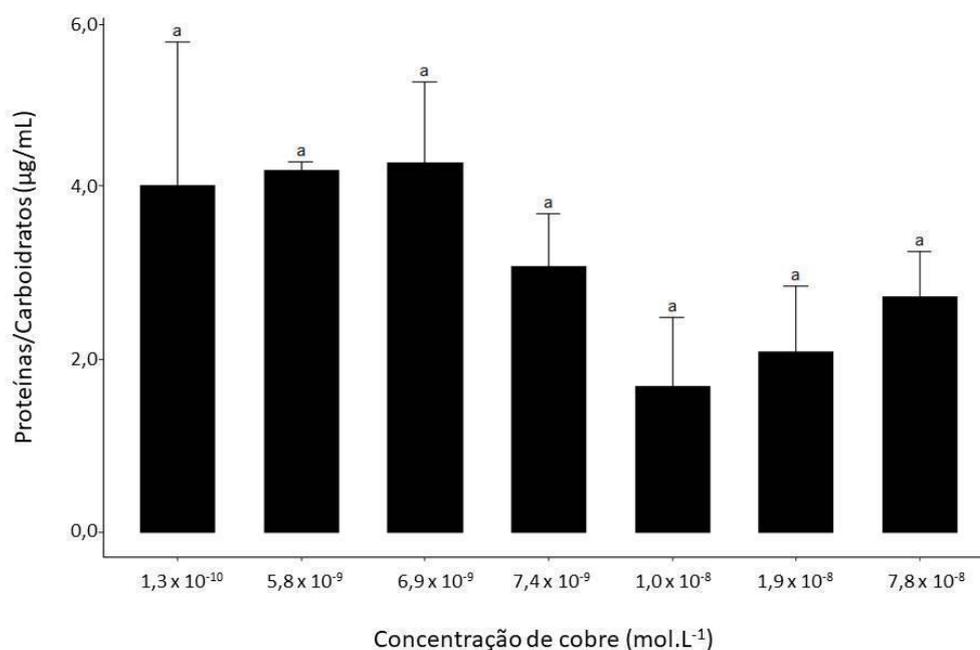


Figura 5. Razão entre Proteínas e Carboidratos totais do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

4.5. Lipídios

Na figura 6, é apresentado o resultado de lipídios totais como porcentagem em relação à biomassa seca. Ocorreu uma diferença significativa entre a concentração de $1,3 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ e os demais tratamentos (ANOVA $p < 0,05$), com exceção do tratamento de concentração de $5,8 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. O controle, o qual apresenta a menor concentração de metal, teve uma maior produção de lipídios.

Algumas espécies de microalgas podem ter a produção de lipídios estimulada quando em situações de estresse por metais como o cobre (Chia et al., 2013). No entanto, isso não ocorreu neste estudo. Uma explicação para a queda da produção de lipídios é o processo denominado peroxidação lipídica, o qual leva à degradação oxidativa dos ácidos graxos. Li et al. (2006) mostrou aumento de peroxidação lipídica em concentrações de cobre no meio acima do controle e causadora de estresse para a microalga *Ankistrodesmus fusiformis*, uma vez que a tolerância ao metal varia de espécie para espécie. Ademais, essa maior porcentagem de lipídios no controle pode ter sido ocasionada pelo estresse da falta de cobre do meio (Jaiswal et al. 2020). Então, como forma de resposta a essa situação de estresse, a microalga pode ter armazenado lipídio como reserva energética emergencial.

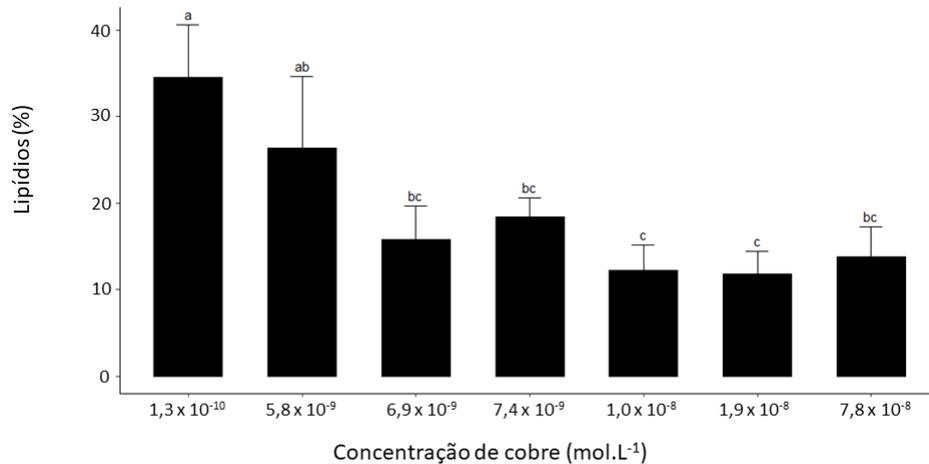


Figura 6. Lipídios totais após 72 h de cultivo da *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

4.6. Biomassa seca, Clorofila α , Clorofilas totais e Carotenoides

A tabela 2 apresenta os resultados referentes a biomassa seca, concentrações de clorofila a , clorofila total, carotenoides totais e a razão clorofila a /carotenóides totais. Ocorreu um aumento na biomassa seca, principalmente na concentração de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, onde houve uma diferença significativa entre esse tratamento e as duas menores concentrações de cobre (ANOVA, $p < 0,05$). Este aumento, pode ou não estar atrelado ao aumento na taxa de crescimento (Hulatt et al. 2011). No caso da *Ankistrodesmus fusiformis*, quando comparamos a biomassa seca (tabela 2) com as taxas de crescimento (figura 2), podemos observar um aumento da biomassa, juntamente da taxa de crescimento.

Outro ponto de destaque nessa tabela é a significativa redução na concentração de clorofila a na maior concentração de metal (ANOVA, $p < 0,05$). Com relação aos carotenoides totais, a única diferença significativa obtida foi entre a concentração de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ livre e a concentração mais alta testada de $7,8 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Assim como encontrado na literatura (Sabatini et al. 2009; Purbonegoro et al. 2018), os resultados obtidos neste estudo mostraram que o excesso de cobre afetou fisiologicamente a microalga, alterando sua composição bioquímica e reduzindo de modo significativo a concentração de clorofilas. Quando o íon cobre encontra-se em excesso, mecanismos essenciais como a respiração mitocondrial e a atividade da proteína plastocianina, além da redução de pigmentos podem ser observados (Knauer and Knauer, 2008).

Tabela 2. Resultados de clorofila *a*, clorofilas totais, carotenoides e a razão clorofila *a*/carotenóides. Letras sobrescritas mostram o resultado da análise estatística, onde letras diferentes significa tratamentos com diferença significativa entre si (ANOVA $p < 0,05$).

Cobre livre [Cu ⁺²](mol.L ⁻¹)	Biomassa seca (mg/mL)	Clorofila <i>a</i> (µg/mL)	Clorofilas totais (µg/mL)	Carotenoides (µg/mL)	Clorofila <i>a</i> / Carotenoides
1,3 x 10 ⁻¹⁰	0,038 ^{bc} ± 0,005	0,45 ^{ab} ± 0,08	0,74 ^{abc} ± 0,12	0,06 ^{ab} ± 0,005	7,65 ^b ± 0,64
5,8 x 10 ⁻⁹	0,040 ^c ± 0,011	0,4 ^{ab} ± 0,06	0,74 ^{abc} ± 0,11	0,06 ^{ab} ± 0,007	8,32 ^b ± 0,29
6,9 x 10 ⁻⁹	0,074 ^{ab} ± 0,018	0,52 ^{ab} ± 0,04	0,96 ^{ab} ± 0,13	0,05 ^{ab} ± 0,004	9,68 ^{ab} ± 1,23
7,4 x 10 ⁻⁹	0,074 ^{ab} ± 0,005	0,51 ^{ab} ± 0,02	0,99 ^{ab} ± 0,04	0,05 ^{ab} ± 0,011	10,62 ^a ± 1,50
1,0 x 10 ⁻⁸	0,079 ^a ± 0,0125	0,60 ^a ± 0,02	1,08 ^a ± 0,09	0,08 ^a ± 0,007	8,09 ^{ab} ± 0,94
1,9 x 10 ⁻⁸	0,071 ^{abc} ± 0,001	0,41 ^{ab} ± 0,05	0,74 ^{abc} ± 0,10	0,05 ^{ab} ± 0,007	8,57 ^{ab} ± 0,49
7,8 x 10 ⁻⁸	0,057 ^{abc} ± 0,009	0,12 ^c ± 0,04	0,29 ^c ± 0,01	0,04 ^b ± 0,016	3,36 ^c ± 0,31

4.7. Razão Clorofila *a*/Carotenoides

A menor razão clorofila *a*/carotenoides foi obtida na maior concentração de cobre, mostrando que o cobre afetou a síntese de pigmentos. O leve aumento que ocorreu na produção de carotenoides, na concentração de 1,0 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹ de cobre livre pode ter ocorrido como uma maneira de proteger o centro reacional fotossintético (Varela et al. 2015), consequentemente as clorofilas *a*.

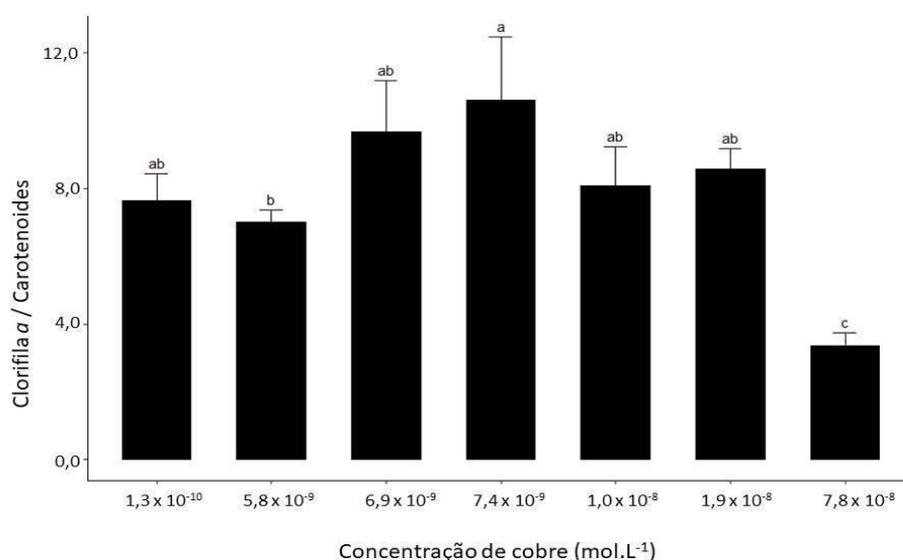


Figura 7. Razão entre Clorofila *a* e carotenoides totais em 72 h do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

4.8. Atividade antioxidante (DPPH)

Neste estudo com *A. fusiformis*, não foi observado aumento de atividade antioxidante conforme aumentou-se a concentração de cobre (ANOVA $p>0,05$). Na concentração mais alta do metal, o potencial antioxidante ficou abaixo do limite de detecção do método, o que contradiz as expectativas baseadas na literatura (Sabatini et al. 2009, Li et al. 2006, Hamed et al. 2017). As diversas espécies de microalgas possuem diferentes estratégias para lidar com situações de estresse bioquímico, como o aumento da produção de antioxidantes em resposta às espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem ser geradas em situação adversa (Hamed et al. 2017). Uma possível explicação para esse resultado é justamente as diferentes formas de defesa antioxidante nas espécies de microalgas, como a síntese de proteínas ligadoras de metais, estímulo das enzimas catalase e superoxide dismutase (SOD), conforme discutido em Sabatini et al. (2009).

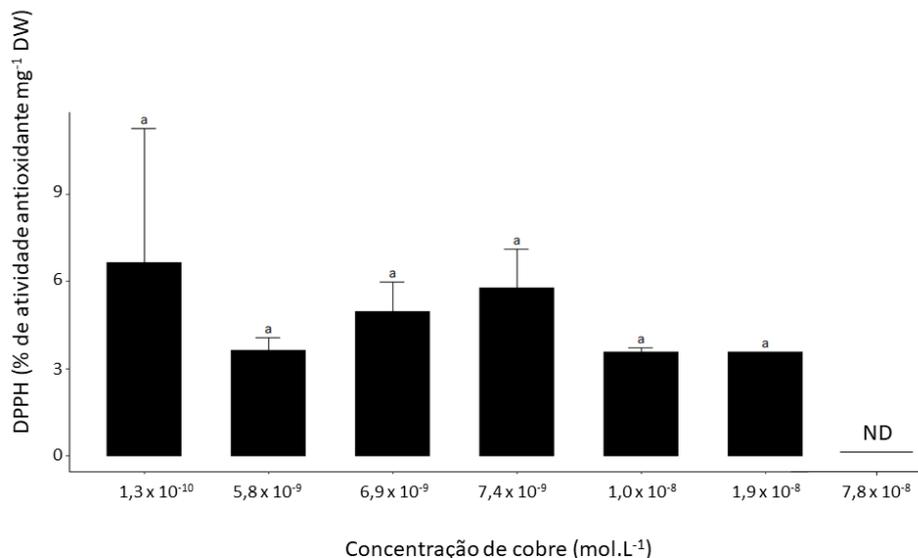


Figura 8. Porcentagem de atividade antioxidante em 72 h do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. A concentração mais elevada do metal cobre de $7,8 \times 10^{-8} \text{ Cu}^{+2} \text{ mol}^{-1}$ não teve atividade antioxidante detectada (ND: Não detectado). Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p>0,05$).

4.9. Parâmetros fotossintéticos

Ao analisarmos as figuras (9 e 10) e observarmos os valores referentes aos parâmetros fotossintéticos qP (energia que foi direcionada para a fotoquímica da fotossíntese) e NPQ (mecanismo de dissipação do excesso de energia luminosa na forma de calor), constatamos que qP se manteve constante em todas as concentrações de cobre (ANOVA $p>0,05$), enquanto os valores de NPQ variaram significativamente (ANOVA $p<0,05$). Na concentração intermediária de $7,4 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, houve um aumento nos valores de NPQ em comparação com as concentrações mais baixas e a mais elevada de

cobre ($1,3 \times 10^{-10}$, $5,8 \times 10^{-9}$ e $7,8 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺). Isso pode indicar que a microalga estava buscando manter a fotossíntese (valores de qP constantes), o que obteve com sucesso, protegendo-a por meio do NPQ. O aumento que observamos nos valores de NPQ, seguido pela queda na concentração mais elevada do metal, não é de todo incomum, podendo ser o resultado de estresse oxidativo causado pela maior concentração do cobre (Chen et al. 2016). Na concentração mais elevada do metal, a capacidade de regulação do NPQ pela microalga pode ter sido afetada levando à redução observada.

No anexo 1 temos as curvas rápidas de luz (RLC), as quais têm se mostrado uma ferramenta sensível para avaliar a resposta fotossintética de microalgas expostas a diferentes condições, sendo possível detectar efeitos subletais do cobre. Com base na análise estatística, observamos que o parâmetro fotossintético α (figura 9) não teve uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA $p > 0,05$). Os valores constantes de α (eficiência no uso da luz absorvida para a fotossíntese), mostram que os mecanismos de defesa da microalga para os seus centros reacionais fotossintéticos foram efetivos.

No entanto, apesar dos valores constantes de α (figura 11), os valores de ETRmax (figura 12) e Ek (figura 13) tiveram uma queda significativa (ANOVA $p < 0,05$) na concentração mais alta de cobre ($7,8 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹). Tal comportamento pode indicar que nessa concentração o cobre começa afetar os centros reacionais fotossintéticos da microalga, podendo ocasionar uma menor eficiência fotossintética. Isso por sua vez teria como resultado uma queda na ETRmax e no Ek, já que o Ek está sendo limitado pela capacidade da microalga em transportar elétrons.

4.9.1 Parâmetros fotossintéticos e síntese de pigmentos

A queda na síntese de pigmentos, que são essenciais para a absorção de luz e regulação de diversos mecanismos nas microalgas, pode impactar diretamente os parâmetros fotossintéticos (Macintyre et al. 2002; Kana et al. 1997). Na concentração mais elevada do metal, observamos uma queda nos parâmetros fotossintéticos NPQ, ETRmax e Ek e, nessa mesma concentração, uma queda na síntese de clorofilas totais, indicando que redução na síntese de pigmentos pode levar a uma menor eficiência fotossintética e conseqüentemente afetar esses parâmetros.

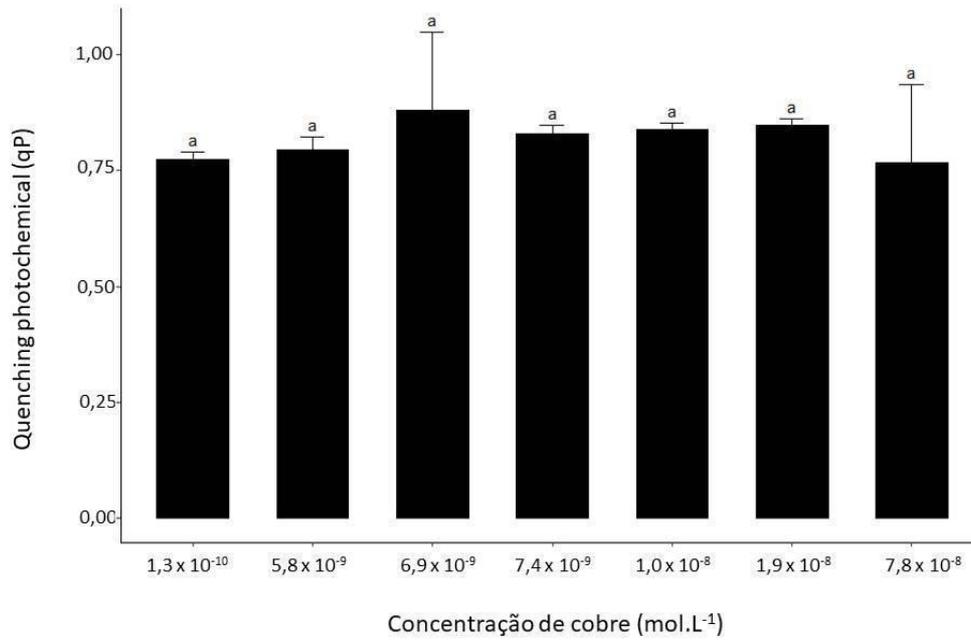


Figura 9. Valores do parâmetro de fluorescência quenching fotoquímico (qP) em fase exponencial do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

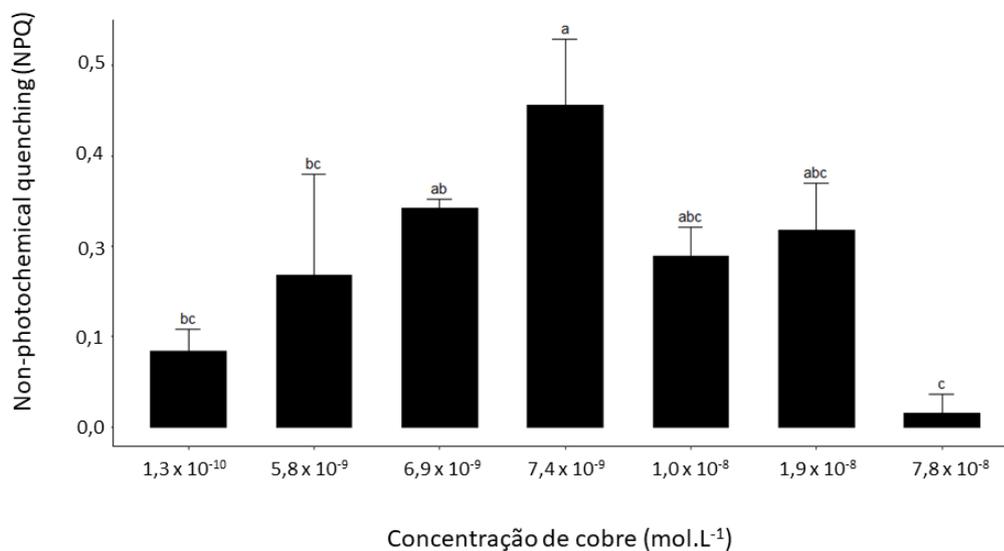


Figura 10. Valores do parâmetro de fluorescência quenching não fotoquímico (NPQ) em fase exponencial do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

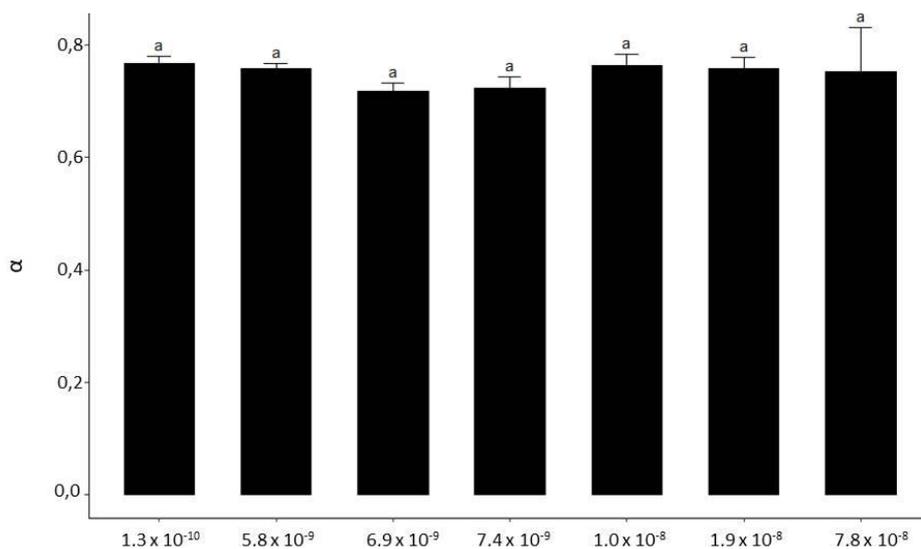


Figura 11. Valores da eficiência de absorção de luz do fotossistema II (α) obtidos após o ajuste RLC, de acordo com Platt et al. (1980), do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

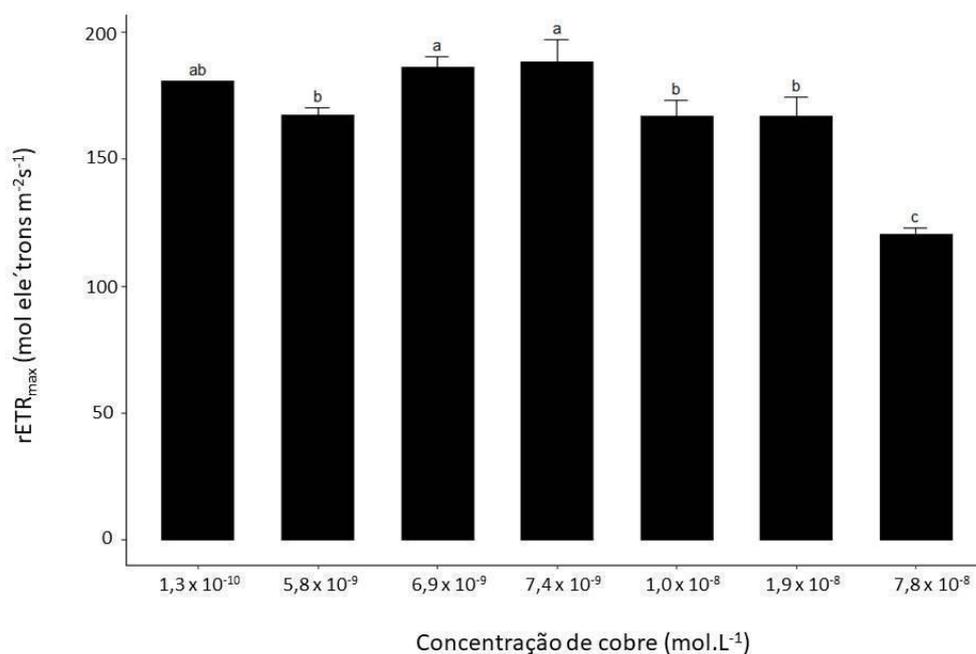


Figura 12. Valores da taxa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) obtidos após o ajuste RLC, de acordo com Platt et al. 1980, do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

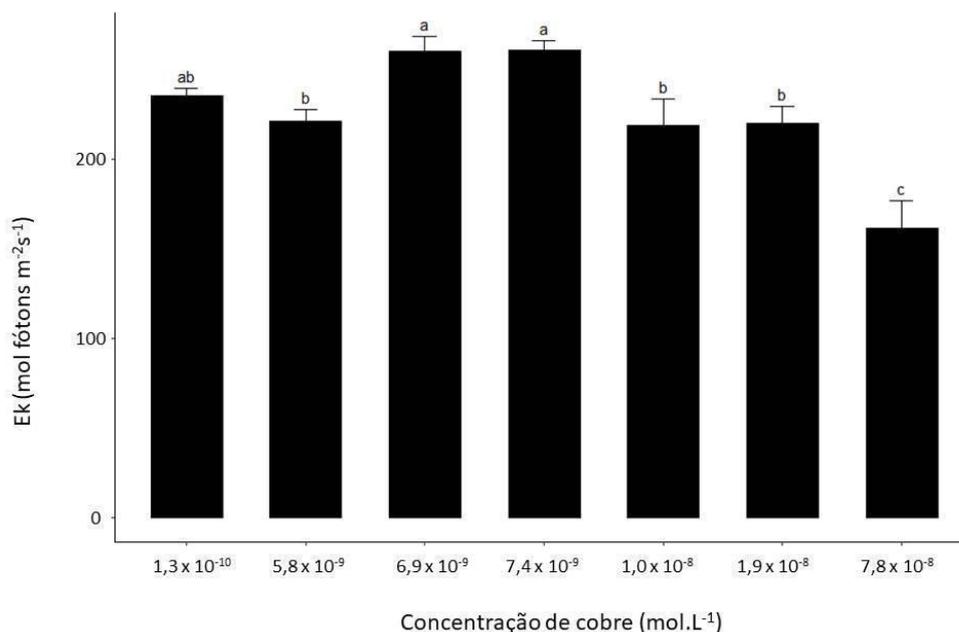


Figura 13. Valores da irradiância de saturação da fotossíntese (E_k) obtidos após o ajuste RLC, de acordo com Platt et al. 1980, do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre. Tratamentos com as mesmas letras não apresentam diferença significativa entre si (ANOVA $p > 0,05$).

5. Considerações finais

Após analisar os resultados desta pesquisa, pode-se concluir que as diferentes concentrações de cobre impactaram significativamente a fisiologia da microalga *Ankistrodesmus fusiformis*. Observou-se um efeito estimulante em concentrações intermediárias do metal, destacando-se as concentrações de $6,9 \times 10^{-9}$ e $7,4 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺, nas quais obtivemos quase duas vezes mais biomassa seca do que no controle, bem como maior produção de carboidratos e proteínas (praticamente três vezes mais que o controle). Isso mostra que o cobre em concentrações adequadas pode levar ao estímulo de compostos orgânicos e ao aumento do crescimento populacional da microalga *Ankistrodesmus fusiformis*. No entanto, foi detectado um efeito tóxico na concentração mais alta testada ($7,8 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ Cu²⁺), sendo cerca de 10 vezes maior do que as concentrações indutoras do efeito estimulante. Além disso, com base na taxa de crescimento, que reflete a situação geral da célula, foi possível constatar que a concentração de cobre presente no controle pode não ser a ideal para o desenvolvimento ótimo da microalga *A. fusiformis*.

Com relação aos pigmentos e aos parâmetros fotossintéticos, nota-se que na concentração mais elevada de cobre ($7,8 \times 10^{-8}$ mol.L Cu²⁺) ocorreu uma redução na síntese de pigmentos e nos parâmetros fotossintéticos NPQ, ETRmax e E_k , indicando que o cobre, em

concentrações acima da requerida, pode afetar a síntese de pigmentos e conseqüentemente a fotossíntese em microalgas.

6. Referências

- AFKAR E. et al. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. *American Journal of Environmental Sciences*, v. 6, n. 3, p. 230, 2010.
- ALBALASMEH, A. 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, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ANDERSEN, Robert A. (Ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier, 2005.
- CAMACHO, F; MACEDO, A; MALCATA, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. *Marine drugs*, v. 17, n. 6, p. 312, 2019.
- CEDENO-MALDONADO, A.; SWADER, J. A. Studies on the mechanism of copper toxicity in *Chlorella*. *Weed Science*, v. 22, n. 5, p. 443-449, 1974.
- CHEN, Zunwei et al. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 17910-17918, 2016.
- CID, A. et al. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic toxicology*, v. 31, n. 2, p. 165-174, 1995.
- GANF, George G.; PEDRA, SJL; OLIVER, Roderick L. Uso de proporções de proteína para carboidrato para analisar a deficiência de nutrientes no fitoplâncton. *Pesquisa Marinha e de Água Doce*, v. 37, n. 2, pág. 183-197, 1986.
- GUANZON, N. G.; NAKAHARA, H.; YOSHIDA, Y. Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fisheries science*, v. 60, n. 4, p. 379-384, 1994.
- HAMED, S. M. et al. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 144, p. 19-25, 2017.
- HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, v. 35, n. 2, p. 403-424, 1999.
- HULATT, Chris J.; THOMAS, David N. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, [S. l.], v. 102, n. 10, p. 5775–5787, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.025.
- HUNTSMAN, S. A.; SUNDA, W. G. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth with emphasis on Fe, Mn and Cu [iron, manganese, copper]. *Studies in ecology (USA)*, 1980.

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

KÄLLQVIST, T.; MEADOWS, B. S. The toxic effect of copper on algae and rotifers from a soda lake (Lake Nakuru, East Africa). *Water Research*, v. 12, n. 10, p. 771-775, 1978.

KANA, Todd M.; GEIDER, Richard J.; CRITCHLEY, Christa. Regulação de pigmentos fotossintéticos em microalgas por múltiplos fatores ambientais: uma hipótese de equilíbrio dinâmico. *The New Phytologist*, v. 137, n. 4, pág. 629-638, 1997.

KHALAJ, M. et al. Copper-based nanomaterials for environmental decontamination—an overview on technical and toxicological aspects. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 813-824, 2018.

KNAUER, S.; KNAUER, K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae 1. *Journal of phycology*, v. 44, n. 2, p. 311-319, 2008.

KONDZIOR, P.; BUTAREWICZ, A. Effect of heavy metals (Cu and Zn) on the content of photosynthetic pigments in the cells of algae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Ecological Engineering*, v. 19, n. 3, 2018.

LEVY, J. L.; STAUBER, J. L.; JOLLEY, D. F. Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, v. 387, n. 1-3, p. 141-154, 2007.

LI, M. et al. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, v. 62, n. 4, p. 565-572, 2006.

LIM, C. Y. et al. Effects of copper(I) oxide on growth and biochemical compositions of two marine microalgae. *Journal of environmental biology*, v. 27, n. 3, p. 461-466, 2006.

LOMBARDI A T, et al. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia*, v. 46, n. 1, p. 74-78, 2007.

LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis research*, v. 108, n. 1, p. 77-87, 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACINTYRE, Hugh L. et al. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria 1. *Journal of phycology*, v. 38, n. 1, p. 17-38, 2002.

MALLICK, N. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, v. 161, n. 5, p. 591-597, 2004.

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.

MASINDI, V.; MUEDI, K. L. Environmental contamination by heavy metals. *Heavy metals*, v. 10, p. 115-132, 2018.

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

MONTEIRO, Cristina M.; CASTRO, Paula ML; MALCATA, F. Xavier. Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress*, v. 28, n. 2, p. 299-311, 2012.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, p. 6, 2017.

PISTOCCHI, R. et al. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *European journal of phycology*, v. 32, n. 2, p. 125-132, 1997.

PLATT, T.; GALLEGOS, C.; HARRISON, W. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal Marine Resource*, [S. l.], 1980.

PURBONEGORO, T. et al. Toxicity of copper on the growth of marine microalgae *Pavlova* sp. and its chlorophyll-a. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2018. p. 012060.

RADETZKI, M. Seven thousand years in the service of humanity—the history of copper, the red metal. *Resources Policy*, v. 34, n. 4, p. 176-184, 2009

RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979 .

ROCHA, G. S.; PARRISH, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae). *Algal Research*, v. 54, p. 102223, 2021.

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.

SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T.. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 161, p. 57-63, 2018.

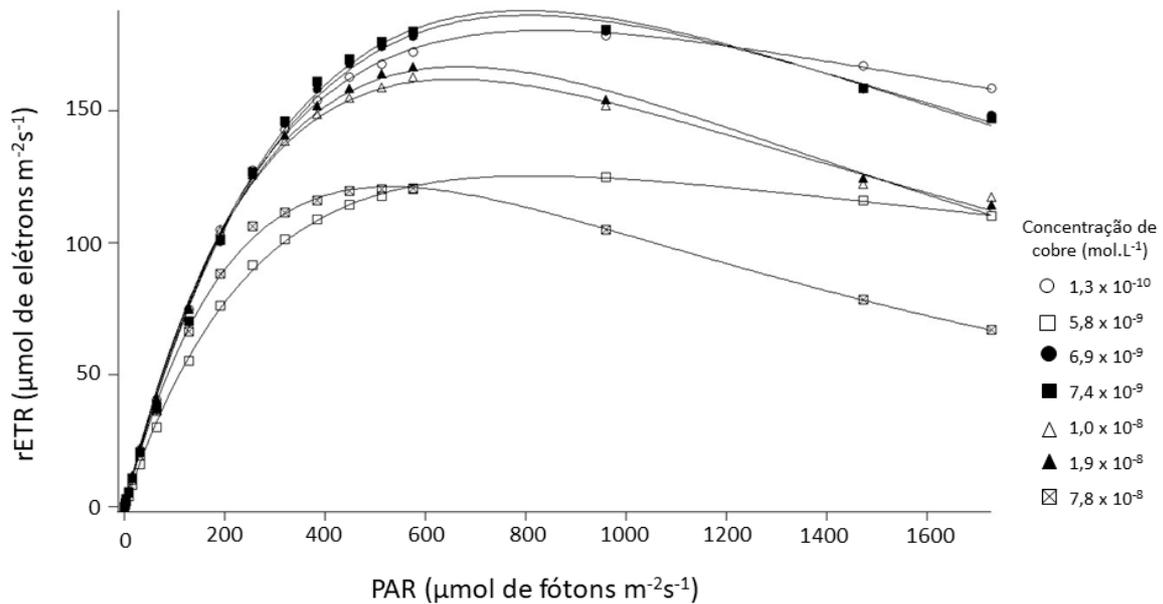
SILVA, Jaqueline Carmo da. Caracterização de microalgas e cianobactérias: abordagens ecofisiológica e biotecnológica. 2022.

VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis research*, v. 125, n. 3, p. 423-436, 2015.

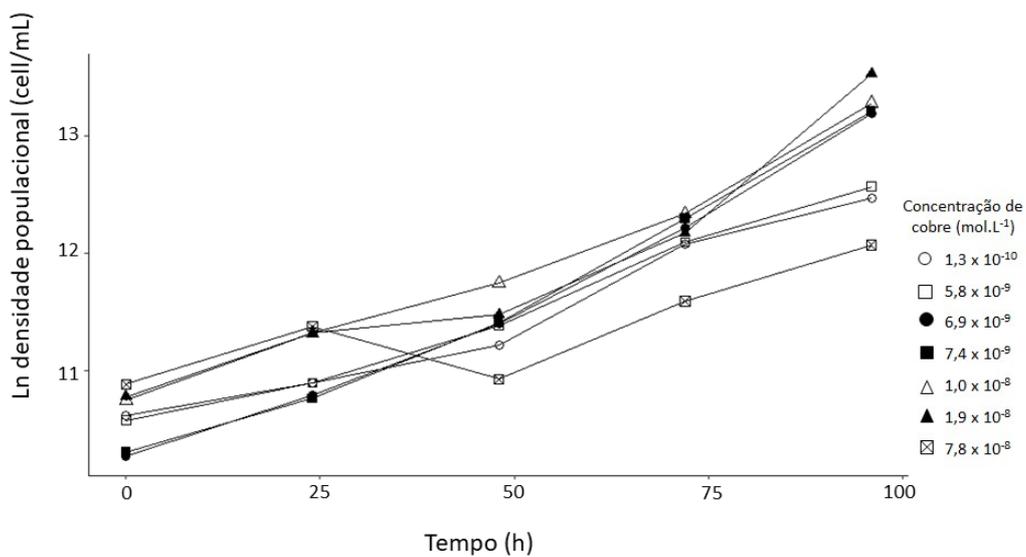
WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

YAAKOB, Zahira et al. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, v. 21, p. 1-10, 2014.

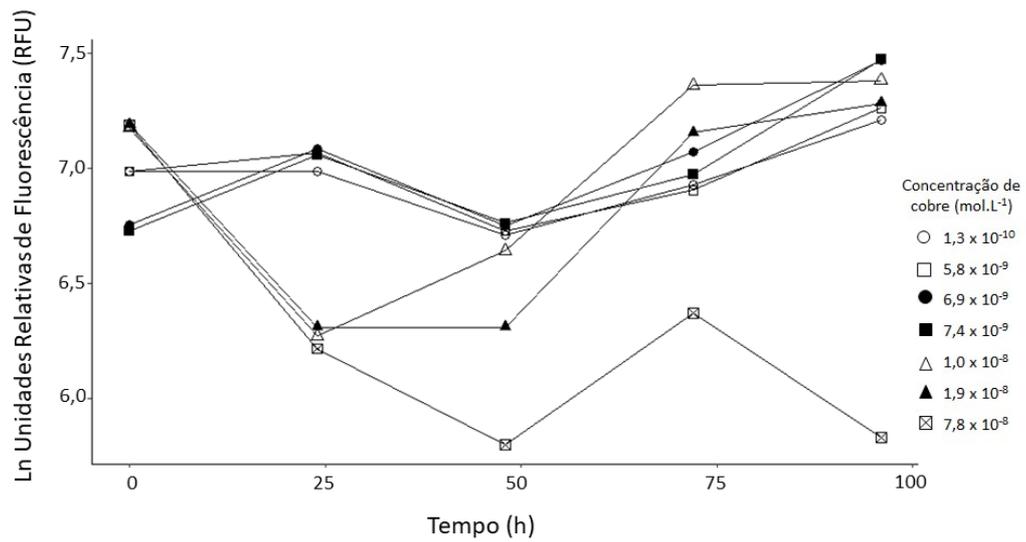
7. Anexos



Anexo 1. Curvas rápidas de luz (RLC) na fase exponencial do cultivo da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre.



Anexo 2. Curva de crescimento ($\text{Ln de densidade celular [cel.mL}^{-1}\text{]})$ em função do tempo experimental da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre.



Anexo 3. Fluorescência (Ln de unidades relativas de fluorescência [RFU]) em função do tempo experimental da microalga *Ankistrodesmus fusiformis* em diferentes concentrações de cobre.