

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

PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS EM ESPÉCIES DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (CHLOROPHYTA) COMO CARACTERÍSTICA QUIMIOTAXONÔMICA E PROSPECÇÃO DE APLICABILIDADE.

Cilene Cristina Mori

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS**, área de concentração: **ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**.

Orientador: Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira

São Carlos – SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M854p Mori, Cilene Cristina
Perfil dos ácidos graxos em espécies de
microalgas de água doce da família Selenastraceae
(Chlorophyta) como característica quimiotaxonômica e
prospecção de aplicabilidade / Cilene Cristina Mori. -
- São Carlos : UFSCar, 2016.
94 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Microalgas. 2. Água doce. 3. Selenastraceae. I.
Título.



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 Tese de Doutorado da candidata Cílene Cristina Mori, realizada em 21/06/2016:


Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
UFSCar


Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar


Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini
UFSCar


Profa. Dra. Vanessa Colombo Corbi
UNIARA


Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna
IB

"Mas eu não quero me encontrar com gente louca", observou Alice.

"Você não pode evitar isso", replicou o gato.

"Todos nós aqui somos loucos. Eu sou louco, você é louca".

"Como você sabe que eu sou louca?" indagou Alice.

"Deve ser", disse o gato, "ou não estaria aqui ..."

Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas (1865)

AGRADECIMENTOS

Agradeço hoje e sempre ao meu orientador Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, não somente pela orientação, mas pela oportunidade de integrar o seu laboratório, pela confiança, paciência, respeito, dedicação, carinho, ensinamentos e por não ser apenas um exemplo de professor a ser seguido, mas, principalmente um exemplo de pessoa.

Ao Prof. Christopher Parrish, por ter me recebido tão bem em seu laboratório no Ocean Science Centre, em St. Johns, Canadá, pela dedicação em me ensinar tudo que estava ao seu alcance e, pela infinita simpatia, carinho e parceria.

Aos amigos e colegas de laboratório, pelas risadas, colaborações, discussões e bons momentos que passamos juntos. Em especial as meninas que participaram mais ativamente de todo o tempo de convívio, pelas cervejas, pela amizade e carinho sempre.

À Inessa pela ajuda infinita nas análises estatísticas, correções, discussões, orientações, bobagens, choros e reclamações.

À Leticia pela paciência em me ouvir falar muito (rs), por ajudar, pelo bate papo, formatações, configurações, correções e parceria em experimentos e viagens.

À Thais pela ajuda nas análises e em experimentos, identificações, correções, discussões (risos), esclarecimentos, hospedagens, crises, conselhos, carinho, preocupação, etc.

À Helena pelas palhaçadas bate papo, risadas e parceria em geral. À Ingridt, pela ajuda em vários experimentos, apoio e carinho. À Naiara pelo carinho, risadas e apoio sempre. À Érika, minha própria japinha, apesar de nova entre nós, é alguém que quero muito bem. Obrigada a todas!

Ao Luiz Sartori pela ajuda em todas as minhas etapas aqui no lab, pelas broncas, carinho e muitos ensinamentos.

Ao Luisinho pelas agradáveis coletas de campo, com muita risada, parceria e aprendizagem.

Aos professores que contribuíram na qualificação deste trabalho, Profa. Dra. Marcela B. da Cunha Santino, Profa. Dra. Inessa L. Bagatini e o Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (Química).

Às professoras que fizeram parte da banca de defesa deste doutorado, Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna, Profa. Dra. Odete Rocha, Profa. Dra. Vanessa Colombo Corbi, Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini, Profa. Dra. Mariângela Tambellini e a Dra. Thais Garcia da Silva.

Às minhas amigas pessoais, Maricy, Bianca, Pota Maria, Ana Paula, Mari Mari, Josie, Thais Romanini, Nat Drago e Taíla por participarem de vários momentos muito importantes de minha vida.

À Paçoca e a Panqueca, minhas melhores amigas caninas, que sempre me apoiam e me amam sem motivo algum.

À minha prima Dri, por ter se desdobrado para nos ajudar nesses últimos períodos, cuidado de minha família com muito carinho e amor.

A todos os professores do PPGERN pela oportunidade única de aprendizado durante as disciplinas e também aos colegas do PPGERN.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - cujo auxílio tornou possível o desenvolvimento dessa pesquisa, assim como a participação em congressos nacionais e internacionais e ainda o estágio na Memorial University of Newfoundland, Canadá.

À minha família, irmãos, cunhadas, sobrinhos, sogros e principalmente aos meus pais, Bento e Cecília, por todo o amor, carinho, educação e apoio. Amo vocês!

E por fim quero agradecer á peça fundamental para a minha realização pessoal e profissional, ao meu marido Fabricio Moro, por ter acreditado em mim mais do que eu mesma, por sempre me incentivar, estar ao meu lado nos bons e maus momentos, e por agora ter me dado o melhor presente que se pode oferecer... o nosso Bebezinho que acabou de chegar, o João Bento, que participou e ainda tem participado dessa fase da minha vida. Amo vocês, os homens da minha vida!

RESUMO

A identificação de organismos da família Selenastraceae feita através de microscopia óptica e baseada apenas em características diacríticas vem sendo questionada atualmente a partir de estudos moleculares. Conflitos entre os resultados filogenéticos, morfológicos e os genéticos foram constatados após análises de um grande número de espécies de Selenastraceae, sendo que os erros na identificação e, conseqüentemente, na classificação dessas espécies implicam diretamente na subestimação da família Selenastraceae. Uma alternativa para que estes fossem evitados seria a utilização de uma abordagem taxonômica polifásica para essa família, aliando morfologia, genética, fisiologia e quimiotaxonomia. Portanto, a utilização dos ácidos graxos presentes nessas microalgas como alternativa para auxiliar na identificação parece viável. Com base nessas informações, o presente trabalho analisou os ácidos graxos de dezesseis cepas de microalgas pertencentes à família Selenastraceae e encontrou ácidos graxos específicos e que podem diferenciar as cepas de microalgas e apresentou ácidos graxos indicadores das famílias Selenastraceae (C18:3 ω 3 e C18:4 ω 6), Scenedesmaceae (C18:2 ω 6, C18:1 ω 9, C16:2 ω 6) e Oocystaceae (C18:3 ω 6) e, também para os gêneros *Monoraphidium* (C16:1 ω 9 e C16:3 ω 6), *Coelastrum* (C18:1 ω 9) e *Nephrocytium* (C18:3 ω 6). Entre as Selenastraceae foram detectados também ácidos graxos com potencial para a produção de biocombustíveis (C18:1 ω 9), alimentação de animais (C16:0) e poli-insaturados para a suplementação nutricional humana (C18:3 ω 3, C18:2 ω 6 e C16:4 ω 3), de acordo com a fase de cultivo desses organismos.

ABSTRACT

The identification Selenastraceae family organism is performed by optical microscopy only on diacritic characteristics, what has been questioned from recent molecular studies. Conflicts between phylogenetic, morphologic and genetic results were found after analysis of a large number of species Selenastraceae, and misidentification and consequently error in the classification directly leads to that the underestimation of species from Selenastraceae family. An alternative to these errors in identification and classification would be avoided using a polyphasic taxonomic approach to this family, combining to morphology, genetics, physiology and chemotaxonomy. Therefore, the use of fatty acids found in microalgae as an alternative to contribute assist in identification can be feasible. Using this information, this study considered the fatty acids of sixteen strains of microalgae from Selenastraceae family and found specific fatty acids and may differentiate between strains of microalgae and has presented fatty acids indicators from the Selenastraceae families (C18:3 ω 3 and C18:4 ω 6), Scenedesmaceae (C18:2 ω 6, C18:1 ω 9, C16:2 ω 6) and Oocystaceae (C18:3 ω 6) and also genera *Monoraphidium* (C16:1 ω 9 and C16:3 ω 6), *Coelastrum* (C18:1 ω 9) and *Nephrocytium* (C18:3 ω 6). Among Selenastraceae was detected potential with fatty acids for the production of biofuels (C18:1 ω 9), to feeding to animals (C16:0) and polyunsaturated for human nutritional supplements (C18:3 ω 3, C18:2 ω 6 and C16:4 ω 3) according the growing stage of these organisms.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Ácido α -Linolênico

AMDIS – Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System

AMPL – Acetone Mobile Polar Lipid

ARA – Ácido Araquidônico

CCMA-UFSCar – Coleção de Cultura de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos

DHA – Docosahexaenóico

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

FAME – Éster Metílico de Ácido Graxo (Fatty Acid Methyl Esters)

FID – Detector de Ionização de Chama (Flame Ionization Detector)

GC - Cromatografia a Gás (Gas Chromatograph)

LC – Cadeia Longa (Long Chain)

LIN – Ácido Linoleico

MS – Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)

MUFA – Ácido Graxo Monossaturado (Monounsaturated Fatty Acid)

NIST – National Institute of Standards and Technology

NMDS – Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (Non-Metric Multidimensional Scaling)

PUFA – Ácido Graxo Poli-insaturado (Polyunsaturated fatty Acid)

rbcL – Subunidade Grande da RUBISCO (RUBISCO large Subunit)

rDNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico (Ribosomal Ribonucleic Acid)

RT – Tempo de Retenção (Retention Time)

SC – Cadeira Curta (Short Chain)

SFA – Ácido Graxo Saturado (Saturated Fatty Acids)

TAG – Triacilglicerídeo

TD – Transesterificação Direta

TLC – Cromatografia de Camada Fina (Thin-Layer Chromatograph)

WC – Wright's Cryptophyte

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1-1 Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) com a separação das cepas e espécies e o agrupamento das réplicas e dos gêneros das espécies em duas dimensões. | 34 |
| Figura 2-1 Resultado da somatória dos ácidos graxos por grau de insaturação: ácidos graxos poliinsaturado (PUFA), ácidos graxos monossaturados (MUFA) e ácidos graxos saturados (SFA) das cepas de selenastraceae. | 64 |
| Figura 2-2 Resultados das classes lipídicas encontradas a partir do fracionamento dos ácidos graxos das Selenastraceae. As análises foram realizadas por Cromatografia de camada fina Iatroscan-chromarod (TLC – Thin-Layer Chromatograph).. | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 Relação das dezesseis cepas pertencentes à família Selenastraceae e dois grupos externos analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS). Os asteriscos indicam as 13 cepas utilizadas na pré-análise usando três técnicas: TLC, GC / FID e GC/MS..... | 20 |
| Tabela 1.2 Os resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando os perfis de ácidos graxos de cepas e espécies de microalgas utilizando três técnicas analíticas diferentes: cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS), a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID), e Iatroscan-cromatografia em camada fina chromarod (TLC)..... | 29 |
| Tabela 1.3 Os resultados da análise variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando os dados de composição (%) e presença ou ausência (binário) de perfil de ácidos graxos entre as 18 cepas das microalgas utilizando cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC / MS)..... | 29 |
| Tabela 1.4 Biomarcadores potenciais (ácidos graxos indicadores) para as famílias estudadas, como resultado do valor de indicador individual (IndVal, $p < 0,001$) e análise de percentuais de similaridade (SIMPER). (Signif. codes: 0 *** 0.001, ** 0.01, * 0.05)..... | 30 |
| Tabela 1.5 Biomarcadores potenciais (ácidos graxos indicadores) para gêneros estudados, como resultado do valor de indicador individual (IndVal, $p < 0,001$) e análise de percentuais de similaridade (SIMPER)..... | 32 |

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 Relação de dezesseis espécies ou cepas da família Selenastraceae utilizadas na obtenção dos perfis lipídicos por GC/MS. Os asteriscos indicam as cepas utilizadas no experimento comparativo entre as fases de crescimentos exponencial e estacionário..... | 53 |
| Tabela 2.2 Relação de Selenastraceae e seus respectivos dias de cultivo em fases de crescimento exponencial e estacionário, dados baseados em curvas de crescimento celular para cada cepa..... | 59 |
| Tabela 2.3 Perfil dos FAMEs de dezesseis cepas pertencentes à família Selenastraceae analisadas por cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC/MS) | 62 |
| Tabela 2-4: Perfil dos ácidos graxos que apresentaram ou não diferenças significativas de concentração entre as fases de cultivo exponencial e estacionária de microalgas pertencentes à família Selenastraceae cultivadas nas fases: exponencial (EXP) e estacionária (EST). As análises foram realizadas por cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC/MS). As diferenças significativas entre cada tipo de FAME para cada cepa consideraram os valores de $p \leq 0,05$ (- não ocorreram alterações significativas) | 65 |

APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese é apresentada da seguinte maneira: Parte 1 - Introdução geral; Parte - 2 Objetivos; Parte 3 - Capítulo 1 e Capítulo 2 (com resultados, discussões, conclusões e referências bibliográficas); Parte 4 - Conclusão Geral e Anexos.

Cada capítulo foi escrito no formato de um artigo científico, com seus respectivos resumos, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas.

Em virtude da tese ter sido redigida na forma de artigos e ainda haver uma introdução geral e conclusão geral, repetições nos textos tornam-se inevitáveis.

No capítulo 1 apresentamos os resultados obtidos em um estudo sobre a utilização do perfil de ácidos graxos como uma ferramenta quimiotaxonômica auxiliar para a identificação de espécies de microalgas da família Selenastraceae. Para isso foram utilizadas três técnicas analíticas distintas para avaliarmos a melhor forma de obtenção e identificação dos ácidos graxos das microalgas: a cromatografia em fase gasosa (GC/FID), a cromatografia de camada fina (Thin-Layer Chromatograph - TLC) por Iatroscan-Chromarold e a espectrometria de massas (GC/MS).

O segundo capítulo apresenta o perfil lipídico e as classes lipídicas encontradas para as espécies de Selenastraceae estudadas. Destacamos sua importância econômica e ecológica, e ainda apresentamos os resultados sobre a composição lipídica de algumas cepas de Selenastraceae para fases de crescimento distintas.

Por fim, uma breve conclusão geral foi elaborada com base nos dois capítulos apresentados.

As análises de ácidos graxos por cromatografia a gás (GC/FID) e de classes lipídicas (TLC/FID) das microalgas foram realizadas durante o estágio no *Ocean Science Centre*, na Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL, Canadá, sob a supervisão do Dr. Christopher C. Parrish.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 6 |
| HIPÓTESES E OBJETIVOS | 10 |
| CAPÍTULO 1 | 11 |
| OS ÁCIDOS GRAXOS COMO UMA FERRAMENTA QUIMIOTAXONÔMICA PARA ESPÉCIES DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYCEAE). | 11 |
| 1.1. Resumo | 12 |
| 1.2. Abstract | 14 |
| 1.3. Introdução | 16 |
| 1.4. Material e Métodos | 19 |
| 1.5. Resultados | 28 |
| 1.6. Discussão | 35 |
| 1.7. Conclusão..... | 40 |
| 1.8. Agradecimentos | 41 |
| 1.9. Referências Bibliográficas | 42 |
| CAPÍTULO 2 | 47 |
| PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS E CLASSES LIPÍDICAS EM ESPÉCIES DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (SPHAEROPLEALES/ CHLOROPHYTA) E POSSÍVEIS APLICAÇÕES. | |
| 2.1. Resumo | 48 |
| 2.2. Abstract | 49 |
| 2.3. Introdução | 50 |
| 2.4. Material e Métodos | 53 |
| 2.5. Resultados | 59 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 2.6. Discussão | 69 |
| 2.7. Conclusão..... | 75 |
| 2.8. Agradecimentos | 76 |
| 2.9. Referências Bibliográficas | 77 |
| CONCLUSÃO GERAL | 84 |
| ANEXOS | 85 |

INTRODUÇÃO GERAL

A família Selenastraceae

As Chlorophyceae representam diversas linhagens de algas verdes que habitam principalmente ambientes de água doce ou terrestre em todo o mundo, e dentro de Chlorophyceae, a ordem Sphaeropleales compreende diversos *taxa*, com grande importância ecológica (Tippery *et al.*, 2012). Entre eles, a família Selenastraceae, que é constituída por microalgas verdes de água doce, com ocorrência cosmopolita (Krienitz *et al.*, 2001). Os gêneros mais comuns dessa família são *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium*, *Selenastrum* e *Kirchneriella*, os quais possuem características morfológicas específicas, mas aparentemente não tão distintas entre si. Por exemplo, suas células podem ser alongadas ou cilíndricas ou fusiformes, tendo suas terminações pontiagudas ou arredondadas, vivendo em colônias ou em células isoladas, se reproduzindo exclusivamente por autospórea. (Komarék & Fott, 1983; Krienitz *et al.*, 2001; Fawley *et al.*, 2005). Entretanto, os limites morfológicos de várias dessas espécies muitas vezes são subjetivos, levando a erros na diferenciação das espécies.

A identificação da família Selenastraceae tem sido realizada com base em suas características morfológicas através de microscopia óptica há muito tempo (Fawley *et al.*, 2005). Além da morfologia relativamente simples, a complexa identificação desses organismos deve-se também ao fato de apresentarem apenas reprodução assexuada, impossibilitando a utilização do conceito biológico de espécie descrito por Mayr (1942), o autor se refere a populações naturais intercruzantes e que são reprodutivamente isolados e, portanto, aplicados somente para organismos com reprodução sexuada. Por isso taxonomistas adotaram o conceito morfológico de espécies, usando características morfológicas diacríticas para a maioria das algas verdes cocóides (Krienitz *et al.*, 2012). Desta forma, a utilização de caracteres morfológicos para a determinação de espécies de Selenastraceae, principalmente

para gêneros polifiléticos, como *Ankistrodesmus* e *Monoraphidium*, tem sido questionada, e ainda sugerem que a diversidade desta família, tem sido bastante subestimada (Fawley *et al.*, 2005).

Resultados de análises moleculares através dos genes 18S rDNA realizadas por Krienitz *et al.* (2001) e *rbcL* por Garcia *et al.* (2017), para essa família, colocaram em questão a precisão dos diversos *taxa* de Selenastraceae. As dificuldades nas identificações destas espécies, que antigamente pertenciam à ordem Chlorococcales, as tornam interessantes por demonstrarem claramente os conflitos entre abordagens filogenéticas, morfológicas e moleculares (Krienitz *et al.*, 2003). Portanto, a utilização de alguns critérios simples (e.g. presença de pirenóides), para a determinação de gêneros ou espécies em Selenastraceae não pode ser aceita (Krienitz *et al.*, 2001). A ausência de reprodução sexuada poderia levar a um “gradiente” de táxons sem delimitação clara entre as espécies. Por esses motivos Fawley *et al.* (2005) propuseram que uma melhor abordagem para essa família seria um estudo baseado em taxonomia polifásica aliando morfologia, genética, fisiologia e quimiotaxonomia.

Os ácidos graxos e a identificação das microalgas

A quimiotaxonomia é a utilização de meios de classificação ou identificação de organismos com base na sua diversidade química de perfis quantitativos ou qualitativos de ácidos graxos, proteínas, carboidratos e outros (McMullin, 2008). Os estudos sobre a quimiotaxonomia exploram a evolução e a filogenia de organismos por meio de análises químicas de seus metabólitos secundários, indicam um fenótipo que é uma expressão de características genética e das espécies (Takeda, 1993).

Esse sistema de classificação taxonômica polifásica na delimitação de espécies provou ser um esquema reconhecido e praticável, que combina características bioquímicas e fisiológicas, e que obteve sucesso para algumas espécies de *Chlorella* sp., por exemplo (Huss *et al.*, 1999).

Petkov & Garcia (2007), em estudo com *Chlorella minutissima*, obtiveram resultados contraditórios em relação aos ácidos graxos encontrados, o que segundo esses autores, demonstra claramente identificação errônea atribuída a este gênero.

A ampla variedade de ácidos graxos produzidos por um diverso número de microalgas (Harwood *et al.*, 2008; Breuer *et al.*, 2013), tem gerado interesse sobre esses tipos de metabólitos mas, principalmente sobre essas espécies fitoplanctônicas em todo o mundo (Viso *et al.*, 1993).

Os ácidos graxos por sua vez são metabólitos conservados da rota acetil-CoA e têm sido extensamente estudados no contexto quimiotaxonômico em microalgas (Petkov & Garcia 2007; Kumari *et al.*, 2012), sugerindo que a composição dos ácidos graxos poderia caracterizar táxons como classes, ordens, gêneros, e eventualmente até espécies de microalgas, como diatomáceas marinhas (Viso *et al.*, 1993), cianobactérias (Vargas *et al.*, 1998), microalgas verdes (Petkov & Garcia, 2007), etc.

As microalgas como fonte de energia

Além de auxiliar na classificação taxonômica, os ácidos graxos podem ser úteis também como marcadores quimiotaxonômicos, e monitorar mudanças nas comunidades fitoplanctônicas, por fornecerem informações sobre a qualidade nutricional desses organismos para toda a cadeia alimentar (Taipale *et al.*, 2016). Outras aplicações são atribuídas ao recente interesse nas microalgas, e entre elas estão a possibilidade de usar esses organismos como fonte de ácidos graxos essenciais para a nutrição humana, aquicultura ou produção de biocombustíveis (Bergé *et al.*, 2005; Parrish *et al.*, 2014).

Habilidades como a conversão de luz solar em energia química através da fotossíntese, taxa de crescimento mais elevada do que as plantas terrestres, a capacidade de acumular grande quantidade de lipídios em suas células, o crescimento em diversos tipos de sistemas de

cultivo, entre outros, faz com que a produção de biocombustíveis de microalgas seja viável, mas depende da escolha apropriada das cepas (Milano *et al.*, 2016).

Os FAMES

Os triacilglicerídeos presentes nas microalgas são convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - *fatty acids methyl esters*) para produção de biodiesel, e podem ser comparados às oleaginosas, tais como soja e canola, atualmente utilizadas para a produção de biodiesel (Menezes *et al.*, 2013). Como uma alternativa para eliminar algumas etapas no processo de extração e purificação dos lipídios, a transesterificação direta (DT) da biomassa algal, processo adaptado por Hartman & Lago (1973), pode produzir ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de um álcool e um catalisador (ácido ou básico) direto na matriz lipídica por um processo de esterificação “*in situ*”, ou seja, quando a catálise acontece sem a extração prévia dos lipídios (Soares, 2012). Segundo, Griffiths *et al.* (2010), a eficiência da transesterificação tende a aumentar quando há uma combinação entre as catálises ácidas e básicas, como demonstrado em estudos onde a biomassa de microalgas liofilizadas foram submetidas à transesterificação direta (Antoniosi-Filho, 1995; Soares, 2012).

A partir da transesterificação direta dos lipídios extraídos, na forma de FAMES, é possível identificar e quantificar os ácidos graxos usando técnicas de cromatografia a gás, isso porque, os ésteres gerados são mais voláteis que seus compostos de origem (Antoniosi-Filho, 1995).

A cromatografia

A primeira técnica usada para identificar e quantificar os compostos e lipídios individuais foi a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC/FID), que continua sendo usada até os dias atuais. Outra ferramenta analítica amplamente usada para compostos orgânicos é a espectrometria de massas por impacto de elétrons (MS, mass spectrometry electron-impact) que fornecem informações estruturais (Parrish, 2013).

A combinação entre essas duas técnicas analítica de detecção de compostos ou substâncias, é frequentemente utilizada para a análise de compostos voláteis, devido ao seu alto desempenho, pois combina a alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia à obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade da espectrometria (Chiaradia *et al.*, 2008). O espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos íons e o cromatograma contendo todos os íons produzidos é chamado cromatograma de íons totais (total ion chromatogram) (Chiaradia *et al.*, 2008).

Outro tipo de técnica analítica para lipídios de amostras aquáticas é a cromatografia de camada fina (Chromarod Thin-Layer Chromatograph - TLC), utilizando Iatroscan por detector de ionização de chama (TLC/FID). TLC/FID nos fornece informações sobre as classes lipídicas e, a partir das classes, uma medida de lipídios totais (Parrish *et al.*, 2014). Os ácidos graxos são obtidos através da hidrólise de ésteres em classes de compostos como: armazenamento de energia, componentes de membranas, produtos de degradação de lipídios ou até mesmo classes de poluentes (Parrish, 1987; Mourente *et al.*, 1990).

O presente trabalho está vinculado a um projeto temático (Processo 2011/50054-4) que visa efetivar um banco de germoplasma de microalgas crio-preservedo, com identificação por DNA-barcode e informações sobre alguns compostos, como os ácidos graxos, que eventualmente possam ter aplicações ecológicas e econômicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antoniosi-Filho N. R. (1995). Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais. *Tese de doutorado*. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 339p.
- Bergé J-P, Barnathan G. (2005). Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. In: Le Gal Y, Ulber R, editors. *Marine Biotechnology I*. Springer Berlin/Heidelberg. 49–125.
- Breuer, G., Evers, W. A., de Vree, J. H., Kleinegris, D. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2013). Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (80), e50628-e50628.
- de Carvalho, C. C., & Caramujo, M. J. (2014). Fatty acids as a tool to understand microbial diversity and their role in food webs of Mediterranean temporary ponds. *Molecules*, 19(5), 5570-5598.
- Chiaradia, M. C., Collins, C. H., & Jardim, I. C. S. F. (2008). O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química nova*, 31(3), 623-636.
- Fawley, M. W., M. L. Dean, S. K. Dimmer & K. P. Fawley. (2005). Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) *J. Phycol.* (42) 142-154.
- Garcia, T. S., Bock C., Sant'Anna C. L., Bagatini I. L., Wodniok S., Vieira A. A. H. (2017). Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): *rbcL*, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea*.
- Griffiths, M. J., Van Hille, R. P., Harrison, S. T. L. (2010). Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. *Lipids*, (45), p.1053-1060.

- Hartman, L. & Lago, R. A. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v. 22, (8): 475 – 97.
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679-684.
- Huss, V. A., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., ... & Kessler, E. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensu lato* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35(3), 587-598.
- Komárek, J. & Fott, B. (1983). Das Phytoplankton des Süßwassers Systematik und Biologie. 7. Teil: Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales: 1-1044. In: H.J. Elster. & W. Ohle, [Eds]. *Die Binnengewässer*. Stuttgart, Begründet von August Thienemann.
- Krienitz, L., & Bock, C. (2012). Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*, 698(1), 295-326.
- Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D. & Wolf, M. (2003). The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia, Bratislava*. 4: 437-446.
- Krienitz, L., Ustinova, I. & Friedlt, T. (2001). Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 37:852–865.
- Krienitz, L., & Hegewald, D. H. (2003). The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology.
- Kumari, P., Bijo, A. J., Mantri, V. A., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2012). Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry*, 86, 44-56.
- Lewis, T., Nichols, P. D., & McMeekin, T. A. (2000). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 107-116.
- Mayr, E. (1942). Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist. *Harvard University Press, Cambridge, MA: 1-372*.

- McMullin, D. R. (2014). Structural characterization of secondary metabolites produced by fungi obtained from damp Canadian buildings (*Doctoral dissertation, Carleton University Ottawa*).
- Menezes, R. S., Leles, M. I. G., Soares, A. T., Franco, P. I. B., Antoniosi Filho, N. R., Sant'Anna, C. L., & Vieira, A. A. H. (2013). Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*, 36, p.10-15.
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., & Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180-197.
- Mourente, G., Lubian, L. M., & Odriozola, J. M. (1990). Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia*, 203(3), 147-154.
- Parrish C. (1987). Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroscan flame ionization detection. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 44, 722-731.
- Parrish, C. C. (2013). Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography*2013.
- Parrish, C. C., Nichols, P. D., Pethybridge, H., & Young, J. W. (2014). Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia*, 177, p. 85-95.
- Petkov, G. & Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of green alga *Chlorella*? *Biochem. Systemat. Ecol.* 35: 281-285.
- Soares, A. T. (2012). Estudo da extração, da composição química e do teor de lipídeos graxos em microalgas visando sua utilização como matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Dissertação de mestrado*. Instituto de química. Universidade Federal de Goiás, p. 198.
- Taipale, S. J., Hiltunen, M., Vuorio, K., & Peltomaa, E. (2016). Suitability of phytosterols alongside fatty acids as chemotaxonomic biomarkers for phytoplankton. *Frontiers in plant science*, 7.

- Takeda, H. (1993). Chemical composition of cell walls as a taxonomical marker. *Journal of plant research*, 106(3), 195-200.
- Tippery, N. P., Fučíková, K., Lewis, P. O., & Lewis, L. A. (2012). Probing the monophyly of the Sphaeropleales (Chlorophyceae) using data from five genes. *Journal of Phycology*, 48(6), 1482-1493.
- Vargas, M. A., Rodriguez, H., Moreno, J. H., Olivares, J. A., Del Campo, J. A., Rivas, J. & Guerrero, M.G. (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing Cyanobacteria. *J. Phycol.* 34: 812-817.
- Viso, A. C. & Marty, L. C. (1993). Fatty acids from 23 marine microalgae. *Phytochem.* 34:1521-1533.

HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses

- A) A composição lipídica é uma ferramenta auxiliar para diferenciar espécies de microalgas;
- B) Entre os diversos ácidos graxos produzidos pelas microalgas existem compostos de importância econômica e/ou ecológica.

Objetivos

- 1) Testar a utilização do perfil dos ácidos graxos na quimiotaxonomia das espécies do complexo da família Selenastraceae.
- 2) Adicionar informações de marcadores aos dados das espécies a serem incluídas no banco do germoplasma;
- 3) Investigar as possibilidades de aplicações tecnológicas dos ácidos graxos.

CAPÍTULO 1

**OS ÁCIDOS GRAXOS COMO UMA FERRAMENTA QUIMIOTAXONÔMICA
PARA ESPÉCIES DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (SPHAEROPLEALES,
CHLOROPHYCEAE).**

1.1. RESUMO

A família Selenastraceae compreende um grande número de espécies de microalgas verdes de água doce, conhecidas por possuírem características morfológicas variáveis, porém sutis entre si, o que dificulta a identificação dessas espécies dentro da família. Isso faz com que o emprego dos caracteres diacríticos da taxonomia morfológica tradicional não seja efetivo na diferenciação de muitas espécies da família. A quimiotaxonomia baseada em ácidos graxos, mais especificamente nos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês *fatty acid methyl ester*), poderá auxiliar a redimir dúvidas que possam surgir ao empregar outras abordagens, como estudos de sistemática filogenética de algumas espécies da família Selenastraceae. Primeiramente, três técnicas de extração e análises dos FAMEs presentes nas microalgas foram testadas: a primeira técnica foi a Transesterificação Direta (TD) da biomassa algal seca e a análise por espectrometria de massas (GC/MS), a segunda foi a extração e transesterificação com clorofórmio e metanol seguida por análise de Cromatografia a gás (GC/FID) e, por último, extração e transesterificação (clorofórmio e metanol) por cromatografia de camada fina (Thin-Layer Chromatograph - TLC) para separação em classes lipídicas utilizando o Iatroscan-Chromarold. Os testes foram realizados em 13 cepas e 12 espécies, sendo cepas da família Selenastraceae. A análise por TLC forneceu nove classes lipídicas, e pode explicar 67% das cepas e 85% das espécies para a quimiotaxonomia. A análise por GC-FID forneceu 21 ácidos graxos e foi eficiente na separação de espécies, porém, o perfil de ácidos graxos fornecido pela TD-GC/MS foi a que apresentou melhores resultados para a quimiotaxonomia de Selenastraceae, utilizando 13 FAMEs. A separação entre cepas de Selenastraceae explicou 92% da variação do perfil de ácidos graxos obtida pela técnica de transesterificação direta da biomassa (TD) em conjunto às análises de GC/MS, enquanto que a separação entre espécies explicou 85% da variação encontrada. Após a pré-

análise, a técnica de TD utilizando GC/MS foi escolhida entre as demais técnicas testadas. A análise posterior utilizando 18 cepas de microalgas, dentro de oito gêneros, incluindo o recém-descrito gênero *Curvastrum*, demonstrou uma tendência na organização das cepas em relação aos ácidos graxos, resultando no arranjo de três grandes conjuntos na análise de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) e puderam explicar 97% a separação das cepas e 93% das espécies.

1.2.ABSTRACT

The family Selenastraceae comprises a large number of freshwater green microalgae species, known as possessing different morphological features, however subtle to one another, which makes difficult the identification of these species within the family. The chemotaxonomy based on fatty acids, specifically the fatty acid ester methyl (FAME), may help to redeem questions that arise when employing other approaches, such as phylogenetic systematics studies of some species of Selenastraceae. We tested three techniques for extraction and analysis of FAMES present in the microalgae: the first technique is the direct transesterification (DT) of biomass and analysis by mass spectrometry (GC/MS), the second was the extraction and transesterification with chloroform and methanol followed by gas chromatography analysis (GC/FID) and, finally, extraction and transesterification (chloroform and methanol) by TLC (Thin-Layer Chromatograph - TLC) for the separation of lipid classes by using Iatroskan-Chromarold. The tests were performed on 13 strains and 12 species, where 12 were identified as belonging to the Selenastraceae. TLC analysis provided nine lipid classes, and could explain 67% of the strains and 85% of species for chemotaxonomy. GC-FID analysis provided 21 fatty acids and was efficient in the separation of species, however, the fatty acid profile provided by DT-GC/MS showed the best results for chemotaxonomy of Selenastraceae using 13 FAME's. The separation between the Selenastraceae strains explained 92% of the variation in the fatty acid profile obtained by the direct transesterification of the biomass technique (DT) in conjunction with analysis GC/MS as the separation between species explained 85% of the variation found. DT technique using GC/MS was used for further analysis of other strains of microalgae. Further analysis using 18 strains within eight genera, including the newly described genus *Curvastrum*, demonstrated a tendency in the organization of the strains in relation to fatty acids, resulting in the

arrangement of three large sets in the Non-Metric multidimensional scaling analysis (NMDS) and could explain 97% separation of strains and 93% of species.

1.3. INTRODUÇÃO

A família Selenastraceae Blackman & Tansley (1903) abrange as algas verdes arrançadas de forma solitária ou colonial, sem flagelos e morfologia celular simples, com formatos fusiformes, cilíndricas, retas ou falciformes, espirais ou curvadas (Krienitz *et al.*, 2001). A colocação de algumas famílias descritas acima em Chlorococcales, (e.g. Scenedesmaceae e Selenastraceae) foi questionada recentemente, sendo realocadas na antiga ordem Sphaeropleales, de acordo com estudos moleculares (Tippery *et al.*, 2012; Buccheim *et al.*, 2001).

Os representantes das Selenastraceae são habitualmente encontrados em todos os ambientes aquáticos continentais, e podem produzir grandes quantidades de biomassa algais em lagos, ambientes encharcados, reservatórios e rios (Messyasz, 2003; Tas & Gonulol, 2007). A subestimação da riqueza das espécies de Selenastraceae é atribuída às classificações errôneas em nível de gênero e a ocorrência de diversidade críptica, as quais são baseadas em apenas um caractere morfológico de difícil definição e interpretações subjetivas em microscopia óptica (Fawley *et al.*, 2005). Desta forma, o emprego dos caracteres diacríticos da taxonomia morfológica tradicional é considerado insuficiente na diferenciação de muitas das espécies da família. Por esse motivo, Fawley *et al.* (2005) propuseram que uma melhor abordagem para essa família seria um estudo baseado em taxonomia polifásica aliando morfologia, genética, fisiologia e quimiotaxonomia. Pressupõe-se, com base na sua variabilidade morfológica, que devam existir centenas de táxons em Selenastraceae (Fawley *et al.*, 2005). Especialmente por apresentar uma morfologia simples, esta família tem passado por revisões taxonômicas recentes com base na biologia molecular e morfologia, pois a identificação baseada apenas em morfologia não tem demonstrado ser suficiente para elucidar sua filogenia (Garcia *et al.*, 2016; Krienitz *et al.*, 2011).

Geneticamente determinados e evolutivamente muito antigos, os ácidos graxos são metabólitos primários da rota da acetil-CoA, sendo compostos conservados e, portanto, potencialmente utilizáveis como característica quimiotaxonômica (Petkov & Garcia, 2007).

Ao menos 76 ácidos graxos (na forma de metil-ésteres de ácido graxo, do inglês fatty acid methyl ester - FAME) de microalgas já foram identificados como pertencentes a vários *taxa* superiores, como classes e divisões, incluindo Cyanobacteria (Volkman *et al.*, 1997; Vargas *et al.*, 1998; Mooney *et al.*, 2007; Petkov & Garcia 2007; Lang *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2012).

Estudos recentes, baseados na identificação de novos ácidos graxos, reportaram a utilização de perfis lipídicos de algas como biomarcadores (Lang *et al.*, 2011, Taipale *et al.*, 2013, Taipale *et al.*, 2016). Isso é possível, porque as microalgas possuem composição de ácidos graxos diferente entre os diversos grupos algais, de acordo com sua posição quimiotaxonômica (Bergé *et al.*, 2005).

Há um consenso sobre a composição de ácidos graxos diferenciarem as grandes linhas filogenéticas algais, com base na origem dos seus cloroplastos. Os perfis dos grupos estudados até o momento demonstraram que a composição dos ácidos graxos poderia caracterizar níveis taxonômicos específicos como classes, ordens, gêneros, e eventualmente até espécies de microalgas verdes (Petkov & Garcia 2007), haptofitas (Volkman *et al.*, 1997), dinoflagelados (Mooney *et al.*, 2007) e cianobactérias (Vargas *et al.*, 1998). Padrões de FAMES semelhantes foram definidos para o gênero *Dunaliella* Teodoresco (Volvocales, Chlorophyceae) quando cultivadas em condições estritamente idênticas (Viso *et al.*, 1993), pois os ácidos graxos podem ser alterados conforme as condições de cultivos.

Embora existam também evidências contrárias sobre a validade da utilização do perfil de ácidos graxos para discriminação de gêneros ou espécies (Lang *et al.*, 2011), a maioria das incongruências encontradas é principalmente atribuída à identificação morfológica errada das

microalgas (Liu & Li 2001; Poerschmann *et al.*, 2004; Petkov & Garcia 2007) e às contaminações com bactérias e/ou fungos, por outros organismos eucarióticos ou ainda amostras mal purificadas (Petkov & Garcia, 2007).

Abordagens sistemáticas que incluem vários gêneros diferentes de microalgas, especialmente aquelas vindas de habitat de água doce ou terrestre, ainda são desconhecidas e a análise dos perfis de ácidos graxos totais, bem como a sua ocorrência em diferentes classes de lipídios em microalgas é uma área emergente e que se acredita que poderá revelar e identificar novos grupos funcionais (Lang *et al.*, 2011).

Dada a dificuldade encontrada para a taxonomia de Selenastraceae, o uso potencial dos lipídios em quimiotaxonomia e os escassos estudos com essa finalidade em microalgas de água doce, análises de FAMES em espécies pertencentes à família Selenastraceae, no presente estudo foram realizadas a fim de obter mais informações sobre a relação entre os ácidos graxos e a identificação de espécies. Abordagens taxonômicas polifásicas, como as quimiotaxonômicas, associadas à taxonomia morfológica tradicional e à biologia molecular, podem auxiliar na taxonomia e identificação desse grupo complexo e ecologicamente importante em ambientes tropicais de água doce.

1.4. MATERIAL E MÉTODOS

Três técnicas analíticas distintas foram testadas e tiveram seus resultados comparados para análises dos perfis de ácidos graxos: a cromatografia em fase gasosa (GC/FID), o fracionamento em classes lipídicas e cromatografia de camada fina analisadas por Iatroscan-Chromarold (TLC) (Hixson *et al.*, 2013) e análise de espectrometria de massas (GC/MS). Para cada técnica empregada, um procedimento metodológico responsável pela extração dos ácidos graxos e sua posterior conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foi empregado, como descrito a seguir.

A extração para análise em GC/MS utilizando solventes orgânicos foi seguida pela técnica da transesterificação direta da biomassa (TD) (Hartman & Lago, 1973; Antoniosi-Filho, 1995).

Transesterificação (ou derivação) usando H_2SO_4 em MeOH (Hixson *et al.*, 2013) foi adotada para análises de GC/FID e TLC. Todos os métodos usados aqui foram capazes de produzir ésteres metílicos que puderam ser identificados e quantificados com as técnicas analíticas utilizadas.

Seleção das cepas

As microalgas foram obtidas das culturas axênicas mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brasil. Doze cepas pertencentes à família Selenastraceae (Tabela 1.1) foram escolhidas para a análise comparativa de técnicas, incluindo duas cepas da espécie *Ankistrodesmus densus* Korshikov, (CCMA-UFSCar 128 e CCMA-UFSCar 239), porém coletadas regiões e datas diferentes.

Tabela 1.1 Relação das dezesseis cepas pertencentes à família Selenastraceae e dois grupos externos analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS). Os asteriscos indicam as 13 cepas utilizadas na pré-análise usando três técnicas: TLC, GC / FID e GC/MS.

| Cepa | Taxon | Local e data da coleta |
|-----------------------|--|-------------------------------------|
| Selenastraceae | | |
| CCMA-UFSCar 3 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953 | Represa do Broa - SP (1979) |
| CCMA-UFSCar 128 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953* | Represa de Itaipú (2009) |
| CCMA-UFSCar 239 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953* | Represa Matão (2010) |
| CCMA-UFSCar 333 | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953* | Rio Madeira RO (2011) |
| CCMA-UFSCar 83 | <i>Ankistrodesmus flexuosus</i> (Komárek) Ergashev 1974 | Represa Itaipu (2009) |
| CCMA-UFSCar 277 | <i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969* | Lagoa da Glória, - MG (2011) |
| CCMA-UFSCar 455 | <i>Chlorolobion braunii</i> (Nägeli) Komárek 1979* | Analândia (2012) |
| CCMA-UFSCar 123 | <i>Kirchneriella aperta</i> Teiling 1912* | Jataí (1992) |
| CCMA-UFSCar 24 | <i>Monoraphidium arcuatum</i> (Korshikov) Hindák 1970* | Represa do Broa (1979) |
| CCMA-UFSCar 306 | <i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová 1969* | Represa de Guarapiranga (2010) |
| CCMA-UFSCar 176 | <i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová 1969* | Jataí (1993) |
| CCMA-UFSCar 353 | <i>Monoraphidium komarkovae</i> Nygaard 1979* | Pantanal (2011) |
| CCMA-UFSCar 325 | <i>Monoraphidium pseudobraunii</i> (Belcher & Swale) Heynig 1979 | Rio Madeira RO (2011) |
| CCMA-UFSCar 47 | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866* | Represa do Monjolinho UFSCar (2008) |
| CCMA-UFSCar 241 | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866 | Matão (2010) |
| CCMA-UFSCar 350 | <i>Curvastrum pantanale</i> T.S. Garcia 2016* | Pantanal (2011) |
| Oocystaceae | | |
| CCMA-UFSCar 65 | <i>Nephrocytium lunatum</i> West 1892* | Jataí (1987) |
| Scenedesmaceae | | |
| CCMA-UFSCar 60 | <i>Coelastrum sphaericum</i> Nägeli 1849 | Parque Ecológico São Carlos (1986) |

Após a escolha da técnica mais adequada, uma análise quimiotaixonômica mais refinada foi realizada em 18 cepas, sendo três cepas de *Ankistrodesmus densus* (CCMA-UFSCar 3, CCMA-UFSCar 128 e CCMA-UFSCar 239) e duas de *Selenastrum bibraianum* Reinsch (CCMA-UFSCar 47 e CCMA-UFSCar 241), (Tabela 1.1). *Nephrocytium lunatum* West (Oocystaceae) (CCMA-UFSCar 65) e *Coelastrum sphaericum* Nägeli (Scenedesmaceae) (CCMA-UFSCar 60) foram utilizadas como grupos externos.

Curvas de crescimento

Para a determinação da fase de crescimento, as cepas (Tabela 1.1) foram cultivadas em réplicas em frascos de vidro de 1 L com volume de 0,8 L do meio de cultivo WC “Wright’s Cryptophyte” (Guillard & Lorenzen, 1972), pH 7,0. As condições de cultivo foram idênticas para todas as espécies: intensidade luminosa de $\sim 300 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro), sob borbulhamento constante de ar comprimido $0,05 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e sendo o cultivo iniciado com inóculos de 10^4 células/mL, determinados por contagem de células em câmara Fuchs Rosenthal 3.2 (catalog No. 3720, Hausser Scientific, Horsham, PA).

As curvas de crescimento foram obtidas e expressas pela concentração de clorofila-*a* (Chl-*a*) *in vivo* por fluorometria em Fluorômetro Turner Trilogy, equipado com módulo Chl-*a in vivo* (Turner Designs, Sunnyvale, CA); as amostragens foram realizadas em intervalos de no máximo 48h até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento.

Cultivos experimentais

Após a obtenção das curvas de crescimento, as cepas foram cultivadas em trélicas em frascos de vidro de 2 L contendo o volume de 1,8 L de meio de cultivo WC, pH 7.0 e com

concentração inicial de 10^4 células/mL, nas mesmas condições de cultivo descritas anteriormente.

Ao atingirem a metade da fase de crescimento exponencial (determinada pelas curvas de crescimento), as culturas foram concentradas em centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5804), a 10°C e velocidade de 11.5 x g por 10 minutos.

Transesterificação Direta (TD)

A extração de ácidos graxos totais e a conversão para FAMES foi feita segundo o método de Transesterificação Direta (TD) (Hartman & Lago, 1973) e adaptado para microescala (Antoniosi-Filho, 1995). O método de TD empregado foi o “one step”, onde os ácidos graxos são liberados diretamente da biomassa liofilizada durante a transesterificação direta, sem a necessidade de homogeneização e extração com clorofórmio e metanol (Griffiths *et al.*, 2010).

Para realizar a TD, duas soluções foram necessárias: solução esterificante (2,0 g de cloreto de amônio, 60 mL metanol anidro e 3,0 mL de ácido sulfúrico), feita por refluxo em balão de fundo redondo acoplado a um condensador, durante 15 min a 100°C em manta aquecedora (Fisatom modelo 52E – classe 300) e a solução de 0.5 M de metóxido de potássio (CH_3KOH 2,8 gramas de hidróxido de potássio em 100 mL de metanol anidro). A biomassa algal seca (~50 mg) acondicionada em *vials* de vidro, recebeu 3 mL da solução de metóxido de potássio e foi aquecida em banho-maria (10 min a 90°C) e posteriormente resfriada. Após, foram adicionados 9 mL de solução esterificante e foi novamente aquecida (10 min a 90°C, em banho-maria) e resfriada em banho de gelo. Por fim, os extratos receberam 5 mL de n-heptano e 2 mL de água destilada. Os *vials* foram agitados manualmente até a separação das fases. A fase orgânica superior, contendo os FAMES em n-heptano, foi coletada com uma

pipeta *Pasteur*, e recolhidas em frascos de cromatografia de 1,5 mL e acondicionadas em freezer -20°C até as análises cromatográficas.

Os FAMES obtidos por (TD) foram analisados em cromatógrafo a gás Agilent 7890 acoplado ao Espectrômetro de Massa Agilent 5975 (Agilent Technologies, Inc. USA), com coluna Agilent HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox 30 m x 250 µm x 0.25 µm). As análises foram conduzidas sob as seguintes condições: energia eletrônica de 70 eV, temperatura da fonte de íons a 230°C e temperatura para a linha de transferência (Thermal aux. 2) a 280°C. As injeções (trélicas) foram feitas manualmente usando uma micro-seringa. A temperatura do injetor foi programada para 120°C, o volume de injeção foi de 1µL no modo *splitless*. O hélio (5.0 analítico) foi usado como gás de arraste sob pressão de 1.924 *psi* em fluxo total de 15,926 mL/min. A temperatura inicial do forno foi mantida a 70°C durante 10 min, em seguida, sob taxa de aquecimento de 5°C/min atingiu 250°C, se mantendo constante por 15 min até o final da análise das amostras.

A identificação dos FAMES foi feita pela comparação dos tempos de retenção (T.R) dos padrões internos FAME MIX C8-C24 (Supelco Product number 18918) e seus respectivos espectros de massas obtidos através da biblioteca NIST11.L (National Institute of Standards and Technology), do software AMDIS 32 Analysis (Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System) associados aos arquivos de espectros de massas presentes na AOCS “Lipid library” do ScottishCrop Science Research Institute (<http://www.lipidlibrary.com.uk/index.html>).

Cromatografia por detector de ionização de chama (GC-FID) dos ácidos graxos extraídos com clorofórmio e metanol e derivatizados a metil ésteres

Os lipídios foram extraídos a partir das amostras de microalgas utilizando o método descrito por Hixson *et al.* (2013). Resumidamente, 2 mL de clorofórmio (grau HPLC), 1 ml

de metanol (grau HPLC), 1 mL de solução clorofórmio-metanol (2:1) e 1 mL de água de extração (água destilada tratada com clorofórmio) foram adicionados a ~ 50mg de biomassa liofilizada. As amostras em tubos de ensaio foram homogeneizadas durante 30 segundos em vortex, colocadas em sonicador em banho de gelo durante 10 minutos e centrifugadas a 125 x g durante 2 minutos para separar a fase orgânica que contém os lipídios totais. A fase inferior foi cuidadosamente retirada e transferida para frascos de vidro de 20 mL sob um fluxo constante de N₂ em um evaporador (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, EUA).

As biomassas foram submetidas a extração secundária, recebendo dessa vez apenas 3 mL clorofórmio e repassando novamente pelo mesmo processo descrito acima, mas com tempo de sonicação de 4 minutos. Esse procedimento foi realizado 4 vezes para a extração eficiente dos lipídios totais da biomassa. Ao final de cada etapa as fases orgânicas foram recuperadas e transferidas para *vials* de 7 mL, o solvente foi evaporado sob fluxo constante de N₂, então os *vials* foram fechados sob atmosfera inerte, vedados com fita de teflon e armazenados em freezer (-20°C) até o processo de derivatização.

Um total de 1,5 mL de diclorometano e 3 mL de solução de Hilditch (1,5 mL de H₂SO₄ em 100 mL de metanol anidro) foram adicionados aos *vials* contendo o extrato seco, em seguida, os *vials* foram novamente fechados sob N₂. Após 30 segundos em vortex e 4 minutos em sonicador, os *vials* foram levados à estufa por 1 hora a 100°C.

Depois de frios os frascos receberam 0,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio (9 g de bicarbonato de sódio em 100 mL de “água de extração”, água extraída com clorofórmio em funil de separação, *overnight*) para neutralizar os conteúdos.

Em seguida receberam 0,5 mL de hexano e mais uma vez foi agitada em vortex até que as fases fossem separadas.

A fase superior, contendo a mistura dos FAMES em hexano foi transferida para *vials* de cromatografia de 1,5 mL, o hexano foi evaporado sob fluxo de N₂. Finalmente os FAMES

foram ressuspensos com hexano (0,5 mL), tampados e vedados com fita de teflon sob atmosfera de N₂ até realização das análises cromatográficas por detector de ionização de chama (GC/FID).

Alíquotas dos FAMEs (1 µL) foram analisadas em cromatógrafo HP 6890 GC FID equipado com amostrador automático 7683. A coluna utilizada foi a ZB Wax com comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0.32 mm (Phenomenex, U.S.A.).

A temperatura inicial da coluna foi de 65°C, mantida por 0,5 minuto e em seguida aumentada a uma taxa de 40°C/min para 195°C, e mantida nessa temperatura por 15 minutos. Finalmente, a temperatura foi elevada a uma taxa de 2°C/min até 220°C, temperatura na qual permaneceu durante os 45 segundos finais da corrida. O hidrogênio foi usado como gás de arraste sob fluxo de 2 mL/min. A temperatura inicial do injetor foi 150°C, aumentando 120°C por minutos até atingir a temperatura final de 250°C. O detector permaneceu sob temperatura constante de 260°C.

Os picos foram identificados usando o tempo de retenção seguindo os padrões internos (Supelco): FAME MIX, com 37 componentes (Product number 47885-U), Bacterial acid methyl ester mix (product number 47080-U), PUFA 1 (product number 47033) e PUFA 3 (product number 47085-U). Os cromatogramas foram integrados usando o Varian Galaxie Chromatography Data System, versão 1.9.3.2.

Cromatografia de camada fina Iatroscan-Chromarod (TLC)

A Cromatografia de camada fina Chromarod (TLC – Thin-Layer Chromatograph), com a detecção por ionização de chama Iatroscan (FID – Flame Ionization Detector), foi usada para a determinação das classes lipídicas, sendo esse procedimento dividido em três etapas nas Chromarods (Parrish, 1987). Esse sistema utiliza solventes de polaridade crescente para uma completa identificação desses compostos nas amostras, e será descrito abaixo.

Os extratos lipídicos (obtidos pela extração de clorofórmio/metanol e derivatização) foram aplicados às hastes das “Chromarods” com o auxílio de uma micro-seringa. Em seguida, as hastes foram concentradas utilizando acetona 100%, por duas vezes. O primeiro sistema de solventes continha uma mistura de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (98:95:1,0: 0,05). As hastes permaneceram durante 25 minutos nesse sistema e, após esse tempo, foram removidas e levadas à câmara de umidade constante por 5 minutos, e escaneadas (leitura por varredura). Após essa etapa, as hastes foram levadas ao segundo sistema de solventes composto por uma mistura de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (79:20:1), onde permaneceram durante 40 minutos, e depois foram escaneadas. O terceiro sistema subdividiu-se em duas etapas, a primeira foi desenvolvida em acetona 100% durante dois períodos de 15 minutos, e então, mais dois períodos de 10 minutos em clorofórmio: metanol: “água de extração” (5:4:1), em seguida foram secas durante 5 minutos na Iatroscan e, tiveram todo o seu comprimento escaneado novamente. Antes de cada utilização dos sistemas de solventes, as hastes permaneceram durante 5 minutos em câmara de umidade constante. As Chromarods foram calibradas utilizando padrões de Sigma Chemicals (Sigma Chemicals, St. Louis, MI, EUA), e a identificação das classes lipídicas nas amostras foram feitas a partir de curvas de calibração utilizando esses padrões.

Tanto as análises de GC/FID quanto por TLC foram realizadas no Ocean Science Centre, Memorial University of Newfoundland, St. John’s, NL, Canadá.

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote R (R Core Team, 2015). Para os resultados obtidos por GC-FID e GC/MS a concentração relativa de cada ácido graxo para cada réplica foi utilizada como variável (Lang *et al.*, 2011), sendo que valores com menos de 0,5% foram considerados como ruído (Bigogno *et al.*, 2002) e, portanto, retirados

das análises. Os valores brutos (maiores que zero) das diferentes classes lipídicas obtidas por TLC foram utilizadas como parâmetros.

As diferenças significativas no perfil lipídico entre diferentes gêneros e espécies (definidos com base na morfologia) foram testadas por meio da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), utilizando dados não padronizados e o método de distância Euclidiana. A homogeneidade das variâncias foi testada previamente utilizando o comando betadisper do pacote Vegan (Oksanen *et al.*, 2015). As diferenças entre os grupos e similaridades entre réplicas da mesma cepa no perfil lipídico obtido por GC/MS, foram visualizadas por meio de diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS). As distâncias Euclidianas obtidas com dados não transformados foram ordenadas em duas dimensões no NMDS. Os ácidos graxos com diferenças significativas entre os gêneros de microalgas (*Ankistrodesmus*, *Monoraphidium*, *Coelastrum*, *Kirchneriella*, *Selenastrum*, *Curvastrum*, *Chlorolobium* e *Nephrocytium*) foram obtidos por meio de análise de porcentagem de similaridade SIMPER (Similarity Percentages), do pacote Vegan. Em conjunto ao SIMPER, a análise de Valor de Indicador Individual (IndVal) do pacote labdsv (Roberts, 2015) foi realizada para obtenção de ácidos graxos indicadores ($\text{indval} \geq 0,5$ e $p \leq 0,001$) para famílias e gêneros.

1.5.RESULTADOS

Escolha da melhor metodologia para análise dos FAMES

As análises estatísticas indicaram que GC/MS (Tabela 1.2) como melhor técnica para obtenção dos ácidos graxos para quimiotaxonomia das cepas utilizadas. De acordo com a PERMANOVA 92% da variação dos perfis lipídicos obtidos por meio da técnica de GC/MS foi explicado pela separação de cepas, enquanto que a separação de espécies explicou 85% da variação. Os valores foram mais baixos, utilizando a técnica de GC/ FID (85% para as cepas e 73% para a espécie) e a técnica de análise por Iatroscan TCL (67% para as cepas e 66% para as espécies).

Portanto, a técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) foi escolhida para análises quimiotaxonômicas posteriores, devido aos resultados obtidos após o teste inicial, para determinar os perfis de ácidos graxos de novas espécies. Um total de 13 ácidos graxos foram detectados entre as cepas nos diferentes *taxa* estudados.

Tabela 1.2 Os resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando os perfis de ácidos graxos de cepas e espécies de microalgas utilizando três técnicas analíticas diferentes: cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS), a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID), e Iatroscan-cromatografia em camada fina chromarod (TLC).

| | | Df | F test | R² | p |
|-----------------|---------|-----------|---------------|----------------------|----------|
| GC/MS | Cepa | 12 | 22.25 | 0.92 | <0.001 |
| | Espécie | 11 | 12.65 | 0.85 | <0.001 |
| GC/FID | Cepa | 12 | 11.38 | 0.85 | <0.001 |
| | Espécie | 11 | 6.00 | 0.73 | <0.001 |
| Iatroscan (TLC) | Cepa | 12 | 4.12 | 0.67 | <0.001 |
| | Espécie | 11 | 4.45 | 0.66 | <0.001 |

O acréscimo de novas espécies aos perfis de ácidos graxos obtidos por GC/MS, incluindo diferentes cepas de mesma espécie, melhorou os resultados da PERMANOVA. A separação de cepas após este acréscimo explicou 97% da variação, bem como 93% de variação em nível de espécie. Os dados de presença e ausência (binários) de ácidos graxos também tornou possível distinguir entre as espécies de microalgas ($R^2 = 91\%$) (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Os resultados da análise variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando os dados de composição (%) e presença ou ausência (binário) de perfil de ácidos graxos entre as 18 cepas das microalgas utilizando cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC / MS).

| | | Df | F test | R² | p |
|-----------------------------|---------|-----------|---------------|----------------------|----------|
| Dados composicionais | Cepa | 17 | 65.14 | 0.97 | <0.001 |
| | Espécie | 11 | 34.76 | 0.93 | <0.001 |
| Dados binários | Cepa | 17 | 21.71 | 0.91 | <0.001 |
| | Espécie | 11 | 14.24 | 0.84 | <0.001* |

*A heterogeneidade dentro variações podem ter levado a resultados significativos em comparação entre as espécies utilizando dados binários.

Usados em conjunto, as análises de SIMPER e IndVal (Tabela 1.4) mostraram que os ácidos graxos C₁₈ 18:3 ω 3 e 18:4 ω 6 foram indicadores a família Selenastraceae (indval \geq 0.5 e p \leq 0.001). Os dados estatísticos mostraram que os ácidos graxos indicadores para Scenedesmaceae foram 16:2 ω 6, 18:1 ω 9 e 18:2 ω 6, os quais apresentaram diferenças em comparação com as outras famílias. Para a família Oocystaceae, o FAME indicador foi o 18:3 ω 6.

Tabela 1.4 Biomarcadores potenciais (ácidos graxos indicadores) para as famílias estudadas, como resultado do valor de indicador individual (IndVal, p < 0,001) e análise de percentuais de similaridade (SIMPER). (Signif. codes: 0 *** 0.001, ** 0.01, * 0.05)

| Indval | | | SIMPER (Abundância Relativa, %) | | |
|------------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| Família | Cluster | indicator value | Selenastraceae | Scenedesmaceae | Oocystaceae |
| C16:2 ω 6 | Scenedesmaceae | 0.5494 | 1.16 | 2.38 ** | 0.79 |
| C18:1 ω 9 | Scenedesmaceae | 1 | - | 40.05 *** | - |
| C18:2 ω 6 | Scenedesmaceae | 0.5829 | 5.75 | 13.46 *** | 3.89 |
| C18:3 ω 3 | Selenastraceae | 0.5583 | 48.22 | - | 38.15 |
| C18:3 ω 6 | Oocystaceae | 0.9498 | 0.10 | - | 1.89 *** |
| C18:4 ω 6 | Selenastraceae | 0.5915 | 4.00 *** | 2.74 | - |

Os ácidos graxos abundantes na maioria das cepas de Selenastraceae foram os 16:0 e 18:3 ω 3. As cepas de *A. densus* (CCMA-UFSCar 3, CCMA-UFSCar 128 e CCMA-UFSCar 239) mostraram composição semelhante dos FAMES (14:0, 16:2 ω 6, 16:3 ω 3, 16:1 ω 9, 16:0, 18:4 ω 6, 18:3 ω 6, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, e 18:0), resultando no agrupamento da maioria de suas réplicas. *A. densus* (CCMA-UFSCar 128) não apresentou os C₁₈ (18:3 ω 6 e 18:0), porém mostrou um alto conteúdo de FAME C₁₆ 16:4 ω 3.

As espécies do gênero *Monoraphidium* apresentaram FAMES de C₁₄ a C₁₈ 14:0, 16:3 ω 6, 16:4 ω 3, 16:2 ω 6, 16:3 ω 3, 16:1 ω 9, 16:0, 18:4 ω 6, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3 e 18:0. Ambas as análises estatísticas, IndVal e SIMPER, revelaram ácidos graxos indicadores para os gêneros *Monoraphidium* (16:1 ω 9 e 16:3 ω 6), *Coelastrum* (18:1 ω 9) e *Nephrocytium* (18:3 ω 6) (Tabela 1.5).

Tabela 1.5 Biomarcadores potenciais (ácidos graxos indicadores) para gêneros estudados, como resultado do valor de indicador individual (IndVal, $p < 0,001$) e análise de percentuais de similaridade (SIMPER).

| Gênero | Cluster | IndVal | SIMPER (Abundância Relativa %) | | | | | | |
|------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| | | Indicativo value | <i>Ankistrodesmus</i> | <i>Chlorolobion</i> | <i>Coelastrum</i> | <i>Kirchneriella</i> | <i>Monoraphidium</i> | <i>Nephrocytium</i> | <i>Selenastrum</i> |
| C16:1 ω 9 | <i>Monoraphidium</i> | 0.7302 | 0.60 | - | - | - | 1.64 ** | - | - |
| C16:3 ω 6 | <i>Monoraphidium</i> | 1 | - | - | - | - | 2.27 *** | - | - |
| C18:1 ω 9 | <i>Coelastrum</i> | 1 | - | - | 40.05 *** | - | - | - | - |
| C18:3 ω 6 | <i>Nephrocytium</i> | 0.8788 | 0.26 | - | - | - | - | 1.88 *** | - |

Signif. codes: 0 *** 0.001, ** 0.01, * 0.05. Permutation: free Number of permutations: 1000

A análise de NMDS (Figura 1.1) mostrou o agrupamento entre as tréplicas de cultivo das cepas, a eficiente separação entre espécies e uma tendência para grupos de gêneros, resultando no arranjo de três grandes conjuntos no diagrama de NMDS. O primeiro conjunto foi constituído pelas cepas pertencentes ao gênero *Monoraphidium* Komárková-Legnerová (*Monoraphidium arcuatum* Korshikov (CCMA-UFSCar 24), *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová (CCMA-UFSCar 306), *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová (CCMA-UFSCar 176), *Monoraphidium komarkovae* Nygaard (CCMA-UFSCar 353), *Monoraphidium pseudobraunii* (Belcher & Swale) Heynig (CCMA-UFSCar 325). O segundo conjunto foi composto por cepas pertencentes ao gênero *Selenastrum* Reinsch, *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 47 e CCMA-UFSCar 241). Por último, o conjunto foi formado por cepas e espécies pertencentes ao gênero *Ankistrodesmus* Corda, incluindo as cepas das espécies *A. densus* Korshikov (CCMA-UFSCar 3, 128 e 239), *A. fusiformis* Corda ex Korshikov (CCMA-UFSCar 333) e *A. stipitatus* (Chodat) Komárková-Legnerová (CCMA-UFSCar 277), com exceção da cepa de *A. flexuosus* (Komárek) Ergashev (CCMA-UFSCar 83), que não se agregou ao conjunto “*Ankistrodesmus*”. Representantes dos gêneros *Chlorolobion* Korshikov, *Coelastrum* Nägeli, *Kirchneriella* Schmidle e *Nephrocytium* West mantiveram-se dispersos no NMDS, pois eram cepas únicas de seus respectivos gêneros.

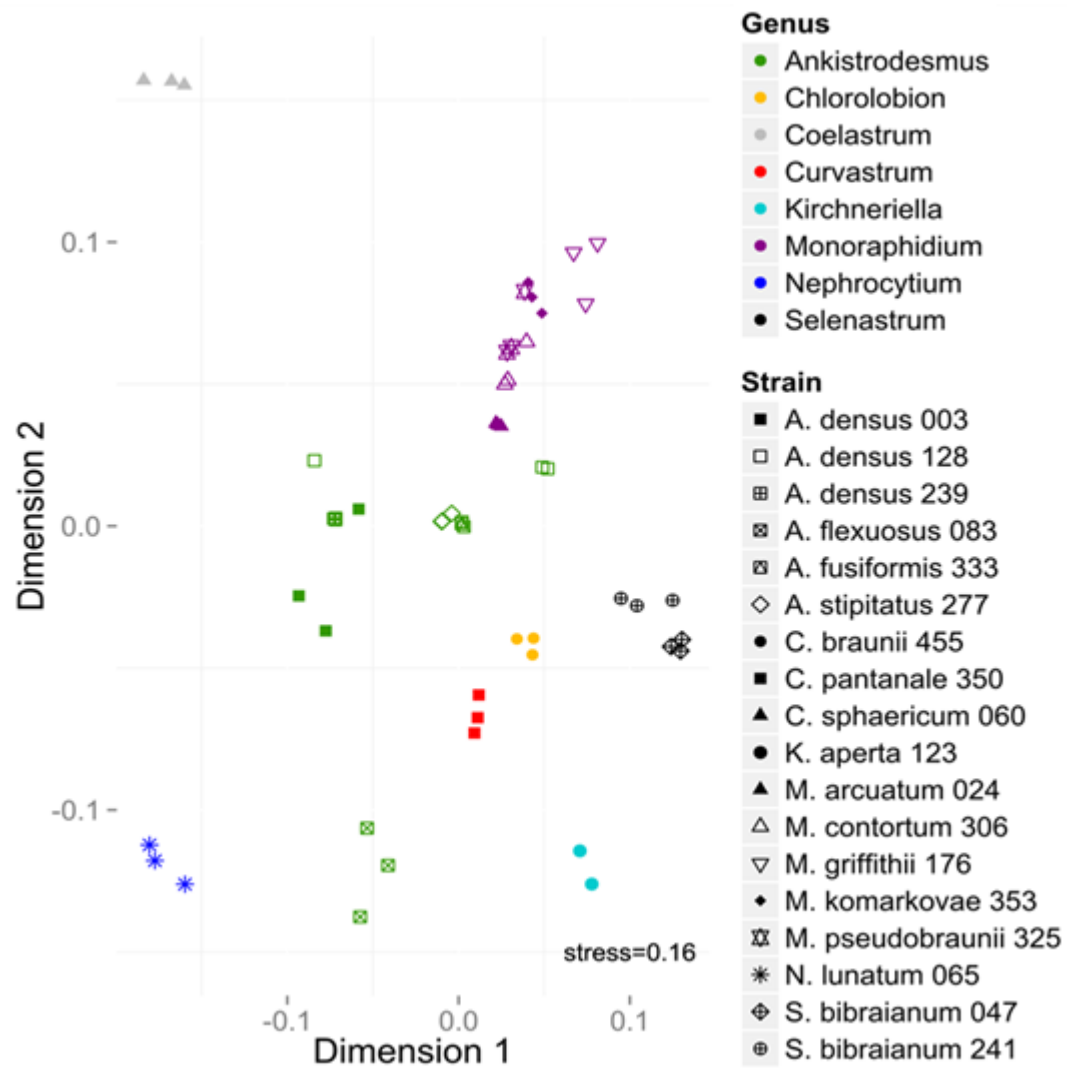


Figura 1.1 Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) com a separação das cepas e espécies e o agrupamento das réplicas e dos gêneros das espécies em duas dimensões.

1.6.DISCUSSÃO

A espectrometria de massa de cromatografia em fase gasosa (GC/MS) foi a técnica escolhida para a análise quimiotaxonômica em Selenastraceae por ser mais precisa na separação de espécies e cepas de microalgas durante a pré-análise. GC/MS é uma das técnicas analíticas mais eficazes e amplamente utilizadas, uma vez que combina o melhor da cromatografia com o melhor da espectrometria de massa (Chiaradia *et al.*, 2008), devido à sua alta capacidade em identificar misturas complexas. A ela é atribuída o progresso nos estudos químicos e bioquímicos dos lipídios marinhos (Bergé *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, o perfil de ácidos graxos obtidos através da utilização da GC/MS pode ser utilizado para separar cepas ($R^2 = 97\%$) e espécies ($R^2 = 93\%$) conforme mostrado pela análise de PERMANOVA. Taipale *et al.* (2013) constataram que a principal razão da variação de ácidos graxos em seu estudo foi a relação filogenética das algas, que foi fixada em nível de Classe e explicou 66% da variação. Não temos dados suficientes para comparar as variações entre classes. Nossos perfis mostraram semelhanças aos ácidos graxos disponíveis na literatura para os mesmos gêneros e/ou famílias taxonômicas (Lang *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Harwanti *et al.*, 2012; Sahu *et al.*, 2013; Taipale *et al.*, 2013).

Embora o único gênero de Scenedesmaceae utilizado em nosso estudo tenha sido *Coelastrum*, os FAMES C_{16} e C_{18} 16:2 ω 6, 18:1 ω 9 e 18:2 ω 6, foram indicadores da família Scenedesmaceae, mas apenas C_{18} 18:1 ω 9 aparece como indicador para o gênero (Tabelas 1.4 e 1.5). O FAME C_{18} 18:1 ω 9 (ácido oleico) tem sido relatado em estudos com Chlorophyceae (Sahu *et al.*, 2013) como ácido graxo abundante em algumas cepas de Selenastraceae e Scenedesmaceae, e sendo determinante como indicador para a cepas da família Selenastraceae (Taipale *et al.*, 2013). Porém, no presente trabalho não foi encontrada em nenhuma cepa de Selenastraceae.

Embora o FAME 18:3 ω 3 tenha sido o ácido graxo mais abundante na maior parte dos perfis lipídicos das microalgas aqui estudadas, ele esteve presente em proporções semelhantes em todos os gêneros. Outros trabalhos incluindo cepas da família Selenastraceae também descreveram o 18:3 ω 3 como um ácido graxo típico de Chlorophyceae (Sahu *et al.*, 2013; Taipale *et al.*, 2013).

A presença e elevada concentração dos FAMES 16:0 e 18:3 ω 3 em cepas de *Monoraphidium* também foi observada por Yu *et al.* (2012), quando avaliaram os ácidos graxos de espécies de *Monoraphidium* como possível matéria-prima para a produção de biocombustível mas também foi abundante em Oocystaceae. No entanto, estudos baseados nos genes 18S rDNA e *rbcL* concluíram que o gênero *Monoraphidium* é polifilético (Krienitz *et al.*, 2001; Fawley *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2017), o que poderia explicar a diversidade de compostos lipídicos dentro desse grupo. Quando analisados em conjunto, os gêneros de Selenastraceae, os FAMES C16:0 e C18:3 ω 3 não foram suficientes para diferenciar significativamente entre os gêneros, embora uma separação tenha sido observada no NMDS (Figura 1.1), contudo, o ácido linolênico não apresentou diferença significativa em relação a cepa da família Oocystaceae, o que pode sugerir que *N. lunatum* possa não ser representante da classe Trebouxiophyceae, o mesmo descrito por Vieira *et al.* (2016) que, segundo o marcador molecular *tufA*, a posicionou entre membros da classe Chlorophyceae.

O ácido palmítico (C16:0) não demonstrou ser um bom indicador, para as famílias e gêneros deste estudo, isso porque foi o segundo FAME mais abundante encontrado em todas as cepas estudadas, e sem diferenças significativas entre elas. Outros estudos quimiotaxonômicos obtiveram resultados semelhantes para esse mesmo FAME, que também é característico de Chlorophyceae (Taipale *et al.*, 2013; Sahu *et al.*, 2013).

Apesar do FAMES C14:0 ter sido encontrado em maior quantidade nas cepas do gênero *Selenastrum*, os valores a ele atribuídos não foram considerados significativamente

indicativos de gênero ou família, pois sua proporção nas demais cepas foi considerada traço ($\leq 1\%$) ou ausente, portanto não considerada estatisticamente e este foi retirado das análises (Bigogno *et al.*, 2002). Diferentes concentrações de ácidos graxos já foram encontradas em cepas da mesma espécie (Petkov & Garcia, 2007). Portanto, o FAME 14:0 não pode estar relacionado com a classe porque *C. braunii* (CCMA-UFSCar 455), *C. sphaericum* (CCMA-UFSCar 60) e *K. aperta* (CCMA-UFSCar 123), representantes da classe Chlorophyceae, bem como a cepa outgroup *N. lunatum* (CCMA-UFSCar 65) da classe Trebouxiophyceae não apresentaram esse FAME, embora em trabalho recente, Vieira *et al.* (2016) teriam levantado a hipótese de que *N. lunatum* não seja uma representante da classe Trebouxiophyceae. A ausência do C14:0 na classe Trebouxiophyceae também tem sido relatada para linhagens de *Botryococcus* sp. (Sahu *et al.*, 2013), *Choricystis* sp. (Taipale *et al.*, 2013) e *Chlorella* sp. (Miranda *et al.*, 2001; Yusof *et al.*, 2011; Alves-Sobrinho *et al.*, 2015). Entre as quatro cepas de Chlorophyceae estudados por Sahu *et al.* (2013), apenas *Chlorella* sp. e *Chlorococcum* sp. apresentaram o FAME 14:0. Para Taipale *et al.* (2013), nem Chlorophyceae nem Trebouxiophyceae apresentaram o C14:0.

Os demais ácidos graxos indicadores para Selenastraceae mostraram proporções similares entre os gêneros da família e, portanto, foram úteis para determinar as famílias taxonômicas quando considerados em conjunto.

As cepas de *A. densus* (CCMA-UFSCar 3, CCMA-UFSCar 128 e CCMA-UFSCar 239), apresentaram similaridade resultando no agrupamento de suas réplicas. Segundo Vieira *et al.* (2016), essas mesmas cepas de *A. densus* quando submetidas a análises filogenéticas para o gene *tufA*, agruparam-se com o máximo de suporte estatístico, demonstrando se tratarem da mesma espécie, tal como observado com os FAMEs para a maioria das réplicas. Esse achado se opõe ao encontrado por Lang *et al.* (2011), que ao analisarem mais de 2000 cepas de microalgas concluíram que o padrão na distribuição dos ácidos graxos foi adequado

como marcador quimiotaxonômico somente para definição de taxa superiores de algas e não para nível de espécie, devido à vasta variabilidade de FAMES encontradas entre elas. Estudos moleculares recentes indicaram a polifilia do gênero *Ankistrodesmus* (Krienitz *et al.*, 2001; Fawley *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2017), onde foi demonstrado que estes indivíduos morfológicamente semelhantes podem pertencer a linhas evolutivas distintas. Fato este que pode explicar a distribuição das cepas deste gênero na análise de NMDS (Figura 1.1). Para o gênero *Ankistrodesmus*, a análise de NMDS agrupou a maioria das cepas e suas respectivas réplicas, com exceção da cepa CCMA-UFSCar 83, identificada morfológicamente como *A. flexuosus*, entretanto, essa cepa não teve sua espécie confirmada por dados moleculares e os ácidos graxos podem ter indicado que há distância entre essas espécies.

O uso de cepas axênicas nos estudos dos perfis lipídicos de microalgas garantiram resultados relevantes na obtenção dos ácidos. A presença de bactéria e/ou fungos nas culturas poderia levar a detecção de diferentes compostos, tais como os ácidos graxos C15:0, C17:0 e C18:1 ω 7, facilmente detectáveis por GC/FID ou CG/MS por serem marcadores provenientes de microrganismos não fotossintetizantes (Mansour *et al.*, 2003).

No diagrama de NMDS (Figura 1.1) nós pudemos ver o agrupamento das réplicas das cepas cultivadas e a separação da família Selenastraceae em três grandes conjuntos de gêneros (*Monoraphidium*, *Ankistrodesmus* e *Selenastrum*). Em nosso estudo, a cepa *Curvastrum pantanale* (CCMA-UFSCar 350), recentemente descrito por Garcia *et al.* (2017) apresentou proximidade filogenética com cepas do gênero *Ankistrodesmus*. Segundo estudo filogenético usando os genes *rbcL* e 18S rDNA. *C. pantanale* diferiu das cepas de *A. stipitatus* e *A. fusiformis* devido à ausência do C16:1 ω 9 em seu perfil, este dado corrobora que determinados FAMES são específicos de alguns gêneros, como *Curvastrum*.

Estudos demonstraram que a espécie *Selenastrum bibraianum* (espécie tipo da família) está bem definida dentro de Selenastraceae baseado em dados moleculares inferidos do

marcador 18S rDNA (Krienitz *et al.*, 2001; Fawley *et al.*, 2005, Garcia *et al.*, 2017) e gene *rbcL* Garcia *et al.* (2017), corroborado pelos dados de NMDS gerados a partir de análise de FAMES das cepas de *S. bibrainum* (CCMA-UFSCar 47 e CCMA-UFSCar 241).

Os estudos sobre os ácidos graxos produzidos por microalgas de água doce podem ir além de sua utilização para a quimiotaxonomia desses organismos. O conhecimento da variada gama de ácidos graxos produzidos pelas microalgas pode estimular importantes aplicações na aquicultura, estudos sobre teias alimentares dos ambientes aquáticos, utilização nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, produção de biocombustíveis entre outras (Parrish *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2016).

1.7. CONCLUSÃO

O presente trabalho é o primeiro a descrever a utilização dos perfis de ácidos graxos como ferramenta quimiotaxonômica auxiliar voltado para a família Selenastraceae. Com a técnica de GC/MS, obteve-se uma diferenciação satisfatória entre as cepas das microalgas de acordo com as análises estatísticas, assim como foram determinados alguns ácidos graxos indicadores para as famílias Selenastraceae (C18:3 ω 3 e C18:4 ω 6), Scenedesmaceae (C18:2 ω 6, C18:1 ω 9, C16:2 ω 6) e Oocystaceae (C18:3 ω 6) e, também para os gêneros *Monoraphidium* (C16:1 ω 9 e C16:3 ω 6), *Coelastrum* (C18:1 ω 9) e *Nephrocytium* (C18:3 ω 6).

Embora as cepas tenham sido inicialmente identificadas através de microscopia ótica baseada somente em sua morfologia, na maioria dos casos, houve consenso entre a quimiotaxonomia, sua taxonomia morfológica e a filogenia. Porém, com base em nossos resultados, os ácidos graxos puderam levantar a hipótese de erro na identificação de algumas cepas de Selenastraceae analisadas nesse trabalho.

Essas informações podem ajudar a resolver questões relativas à identificação/classificação levantada por outras abordagens taxonômicas e a descoberta de novas cepas poderia trazer novos usos e uma melhor compreensão das espécies de microalgas verdes que habitam ambientes aquáticos.

1.8. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos: 2011/50054-4, 2012/19520-1, 2013/03979-8 e 2013/18083-0) pelo apoio financeiro e científico e bolsas de estudo concedidas, e ao Ocean Sciences Centre at the Memorial University of Newfoundland pelas análises de GC/FID e TLC/FID.

1.9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Sobrinho, R. C. M., Vauchinsk, L., Moura, R. R., Primel, E. G., Abreu, P. C. V. & D'oca, M. G. M. (2015). FAME Production and Fatty Acid Profiles from Moist *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* Biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92: 423-430.
- Antoniosi-Filho N. R. (1995). Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais. *PhD dissertation*. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. p.339.
- Bergé J-P, Barnathan G. (2005). Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. In: Le Gal Y, Ulber R, editors. *Marine Biotechnology I*. Springer Berlin/Heidelberg. 49–125.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. & Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochem.* 60:497-503.
- Blackman F. F. & Tansley A. G. (1903). A revision of the classification of the green algae. 64 p. *University College Press*, London.
- Buchheim, M. A., Michalopoulos, E. A. and Buchheim, J. A. (2001). Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18s and 26s rDNA data. *J. Phycol.*, 37: 819–835.
- Chiaradia, M. C., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F. (2008). The state of art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. *Quim. Nova.v. 31::3*: 623-636.
- Fawley, M. W., M. L. Dean, S. K. Dimmer & K. P. Fawley. (2005). Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) *J. Phycol.* 42:142-154.

- Garcia, T. S. (2016). Biodiversidade de Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): características morfológicas e sequenciamento dos marcadores moleculares 18S rDNA, *rbcL* e ITS como base taxonômica tradicional. *PhD dissertation*. Universidade Federal de São Carlos.
- Garcia, T. S., Bock C., Sant'Anna C. L., Bagatini I. L., Wodniok S., Vieira A. A. H. (2017). Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): *rbcL*, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea*.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., Harrison, S. T. L. (2010). Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. *Lipids*, 45:1053–1060.
- Guillard, R. R. L. & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *J. Phycol.* 8: 10-14.
- Hartman, L. & Lago, R. A. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v. 22, 8: 475 – 97.
- Harwati, T. U., Willke, T., Vorlop, K. D. (2012). Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresource Technology* 121: 54–60.
- Hixson, S. M. Parrish, C. C., Anderson, D. M. (2013). Effect of replacement of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil on growth, lipid class and fatty acid composition of farmed juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiol Biochem* 39:1441–1456.
- Krienitz, L., C. Bock, H. Nozaki & M. Wolf. (2011). SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped Chlorophyta. *J. Phycol.* 47(4):880-893.
- Krienitz, L., Ustinova, I. & Friedlt, T. (2001). Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 37:852–865.

- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T. & Feussner, I. (2011). Fatty acid profile and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant. Biology* 11:124.
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C. Y. & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipids extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* 101:575-577.
- Liu, C.P., Lin, L.P. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis sp.* CCMP1324. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:207-214.
- Mansour, M. P., Volkman, J. K. & Blackbourn, S.I. (2003). The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate *Gymnodinium sp.* In batch culture. *Phytochem.* 63:145-153.
- Messyasz, B. (2003). Spatial distribution of chlorococcalean genera in the phytoseston of the Wena and Nielba rivers. - *Oceanological and Hydrobiological studies* (2):33-44.
- Miranda, M. S., Sato, S. & Mancini-Filho, J. (2001). Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultered on special conditions. *Boll. Chim. Farmaceut.* 140: 165-168.
- Mooney, B. D., Nichols, P. D., Salas, M. F. & Hallegraeff, G. M. (2007). Lipid, fatty acid, and sterol composition of eight species of Kareniaceae (Dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins. *J. Phycol.* 43: 101-111.
- Oksanen, J., Blanchet, G. F, Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., M., Stevens, H. H. and Wagner, H. (2015). vegan: Community Ecology Package. *R package version 2.3-1.* <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Parrish C. (1987). Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroscan flame ionization detection. *Can J Fish Aquat Sci* 44:722–731.
- Parrish, C. C., Nichols, P. D., Pethybridge, H., & Young, J. W. (2014). Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia*, 177(1), 85-95.

- Petkov, G. & Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of green alga *Chlorella*? *Biochem. Systemat. Ecol.* 35: 281-285.
- Poerschmann, J., Spijkerman, E. & Langer, U. (2004). Fatty Acid Patterns in *Chlamydomonas* sp. as a Marker for Nutritional Regimes and Temperature under Extremely Acidic Conditions. *Microbial Ecology.* 48: 78-89.
- Roberts, D. W. (2015). labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology. *R package version 1.7-0.* <http://CRAN.R-project.org/package=labdsv>
- Sahu, A., Pancha, I., Jain, D., Paliwal, C. Ghosh, T., Patidar, S., Bhattacharya, S. & Mishra, S. (2013). Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochem.* 89: 53-58.
- Shukla, D.; Thakur, D.S. & Thakur, N. D. (2012). Utilization of mixture of X , XX1, and X2 in imputation for missing data in post-stratification. *Afr. J. Math. Comput. Sci. Res.* 5:78-89.
- Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Gallowat, A. W. E., Ojala, A. & Brett, M. (2013). Fatty acid composition as biomarker of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquat. Microb. Ecol.* 71:165-178.
- Tas, B. & Gonulol, A. (2007). An ecologic and taxonomic study on phytoplankton of a shallow lake, Turkey. *Journal of Environmental Biology* 28(2):439.
- Tipperry, N. P., Fučíková, K., Lewis, P. O. and Lewis, L. A. (2012). Probing the Monophyly of the Sphaeropleales (Chlorophyceae) Using Data From Five Genes. *J. Phycol.* 48: 1482–1493. doi: 10.1111/jpy.12003
- Vargas, M. A., Rodriguez, H., Moreno, J. H., Olivares, J. A., Del Campo, J. A., Rivas, J. & Guerrero, M.G. (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing Cyanobacteria. *J. Phycol.* 34: 812-817.
- Vieira, H. H., Bagatini, I. L., Guinart, C. M., & Vieira, A. A. H. (2016). tuf A gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae*, 31(2), 155-165.
- A. C. & Marty, L. C. (1993). Fatty acids from 23 marine microalgae. *Phytochem.* 34:1521-1533.

- Volkman, J. F., Farmer, C. L., Barrett, S. M. & Sikes, E. L. (1997). Unusual dihydroxysterols. As chemotaxonomic markers for microalgae from the order Pavloales (Haptophyceae). *J. Phycol.* 33: 1016-1023.
- Yu, X., Zhao, P., He, C., Li, J., Tang, X., Zhou, J., Huang, Z. (2012). Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology* 121: 256–2
- Yusof, Y., Basari, J. M. H., Mukti, N. A., Sabuddin, R., Muda, A. R., Sulaiman, S., Makpol, S. & Ngah, W.Z.W. (2011). Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *Afr. J. Biotechnol.* 10:13536-13542
- Zhao, Y., Li, D., Ding, K., Che, R., Xu, J. W., Zhao, P., Li, T., Ma, H., & Yu, X. (2016). Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 through heterotrophic cultivation and photo-chemical modulator induction. *Bioresource Technology*, 211.

CAPÍTULO 2

PERFIS DE CLASSES LIPÍDICAS EM ESPÉCIES DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (SPHAEROPLEALES/CHLOROPHYTA) E POSSÍVEIS APLICAÇÕES.

2.1.RESUMO

A família Selenastraceae (Chlorophyceae) compreende uma grande variedade de gêneros e espécies, entretanto, poucos são os estudos sobre a composição lipídica desses organismos família. Os compostos lipídicos sintetizados por microalgas dessa família ainda são pouco conhecidos, o que as tornam um interessante objeto de estudo, contribuindo para o conhecimento ecológico e fisiológico desses organismos. Há muito tem se discutido também, quais seriam as possíveis alternativas às já utilizadas para a produção de biocombustíveis, ou mesmo sobre a produção de alimentos que sejam ricos em ácidos graxos essenciais que possam atender as necessidades nutricionais humanas e/ou de outros organismos. O presente estudo visou analisar o perfil de classes de lipídios produzidos por microalgas representantes da família Selenastraceae. Para isso, dezesseis cepas de treze espécies pertencentes a essa família foram analisadas. Através da cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (GC/MS) e a Cromatografia de camada fina Iatroscan-Chromarod (TLC – Thin-Layer Chromatograph) tornou-se possível avaliar e determinar os perfis e classes lipídicas produzidas pelas microalgas. Entre as classes lipídicas presentes nas Selenastraceae, os fosfolipídios foram majoritários. Foram encontrados ácidos graxos de grande interesse comercial, como o ácido α -linolênico (C18:3 ω 3 - ALA) e ácido linoleico (C18:2 ω 6 - LIN). Estes que também são precursores de outros ácidos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), ácidos graxos essenciais para o consumo humano e de outros animais. Por fim, diferenciações significativas entre os ácidos graxos foram relatadas para os perfis lipídicos de cepas cultivadas em duas fases distintas de crescimento, indicando que manipulações nas condições de cultivos podem alterar a produção de ácidos graxos pelas microalgas, tanto na qualidade quanto em quantidade, fornecendo subsídios para diversas aplicações.

2.2.ABSTRACT

The family Selenastraceae (Chlorophyceae) comprises a wide variety of genera and species, however, there are few studies on the lipid composition of these organisms. Composition of lipids synthesized by these microalgae is poorly known, and as organisms abundant in various types of water bodies, these studies become an interesting subject, contributing to the ecological and physiological knowledge of these organisms. There has been a recurring discussion about possible alternatives for the production of biofuels, in addition to those already in uses, and for the production of foods that are rich in essential fatty acids to human health as well as for animals with commercial interests. Therefore, this study aimed to analyze the lipid profile and classes produced by Selenastraceae representatives, beginning sixteen strains of thirteen species belonging to Selenastraceae analyzed. Using gas chromatography techniques united to mass spectrometer (GC/MS) and Thin-Layer Chromatography Iatroscan-Chromarod (TLC - Thin-Layer Chromatograph), it was possible to evaluate and determine the lipid profiles and classes produced by the microalgae. Among lipid classes present in Selenastraceae, phospholipids were majority and in the results obtained for profile. Also fatty acids of great commercial interest were found, such as α -linolenic acid (C18:3 ω 3) and linoleic acid (C18:2 ω 6). There are also precursors of other long chain polyunsaturated acids (LC-PUFA) that are essential fatty acids for human consumption and for other animals. Finally, differences between the fatty acids were reported to lipid profiles of strains cultivated in two different stages of growth.

2.3. INTRODUÇÃO

A grande diversidade de microalgas verdes de água doce (Chlorophyta) pressupõe uma alta diversidade nos perfis de composição dos seus ácidos graxos (Pratoomyot *et al.*, 2005). Microalgas pertencentes a vários *taxa* superiores como classes e divisões (phyla), incluindo as Cyanobacteria (Volkman *et al.*, 1997; Vargas *et al.*, 1998; Mooney *et al.*, 2007; Petkov & Garcia, 2007; Lang *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2012) já tiveram seus ácidos graxos identificados. Porém, são poucas as espécies de microalgas verdes de água doce prospectadas, principalmente as oriundas de regiões tropicais.

As condições de cultivo das microalgas podem propiciar a modificação do perfil desses compostos, todavia a composição de perfis estudados até o momento mostra que a ocorrência de um conjunto de ácidos graxos pode determinar um perfil particular para níveis taxonômicos como classes, ordens, gêneros, e eventualmente até espécies de microalgas, verdes (Petkov & Garcia, 2007), haptofitas (Volkman *et al.*, 1997), dinoflagelados (Mooney *et al.*, 2007) e de cianobactérias (Vargas *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 2012).

Essas alterações nas condições de cultivos e, conseqüentemente na produção de lipídios em microalgas podem ser afetadas por muitos fatores ambientais como luz, temperatura, salinidade, concentração de CO₂, concentração de nutrientes, etc. (Shifrin & Chrisholn, 1981; Thompson *et al.*, 1992; Brown *et al.* 1996; Pronina *et al.*, 1998; Yee *et al.*, 2016). Entretanto, as fases de crescimento, ou idade do cultivo, têm um efeito mais crítico na composição e rendimento dos lipídios (Dunstan *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997; Mansour *et al.*, 2003). A maioria desses fatores interfere quantitativamente no perfil dos ácidos graxos, mas alguns podem interferir também na composição qualitativa de cada ácido graxo.

Embora muitas espécies tenham já sido analisadas sob esses aspectos, resultados contraditórios têm sido encontrados para diferentes espécies ou para as mesmas espécies, mas em condições de cultivo diferentes (Hodgson *et al.*, 1991; Fidalgo *et al.*, 1998). Em geral as microalgas sintetizam compostos lipídicos principalmente na forma de fosfolipídios, diglicerídeos e triacilglicerídeos (TAG) nas membranas celulares e como compostos de reserva energética. Entretanto, não está ainda claro como as proporções intracelulares de ácidos graxos variam com a fase de crescimento em diferentes espécies. Portanto, a definição de “perfil de ácidos graxo” aqui utilizado refere-se não somente à composição dos ácidos graxos de cada espécie, mas também, às variações na composição e proporções de cada ácido graxo no “pool” desses compostos em cada espécie estudada sob condições de cultivo normatizadas para todas elas.

O conhecimento da composição bioquímica de espécies fitoplanctônicas oferecidas como alimento, principalmente a organismos de interesse econômico agregado, é essencial a fim de estabelecer uma dieta adequada para larvas de bivalves (Férrandez-Reiriz *et al.*, 1989), atum (Parrish *et al.*, 2014) e para produção de biocombustível (Selvarajan *et al.*, 2015).

Entre os lipídios, certos ácidos graxos essenciais como ômega-3, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA) ($\geq C_{20}$) são considerados importantes na determinação da saúde dos ecossistemas, assim como também a presença do ácido α -linolênico (ALA), $C_{18} 18:3\omega 3$, precursor da síntese dos LC-PUFAs (ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa) (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009). Os ácidos graxos também são uma valiosa ferramenta em estudos ecológicos por causa de sua natureza heterogênea, e as informações fornecidas pelos ácidos graxos marcadores utilizados para diferenciar os diversos grupos fitoplanctônicos, podem ser utilizados para delinear a ciclagem de carbono e a transferência de material através das teias alimentares (Parrish *et al.*, 2013).

As microalgas verdes (Chlorophyta) são o principal grupo de algas em alguns ambientes de água doce tropicais e sub-tropicais e, portanto, têm um papel de destaque na cadeia alimentar desses ambientes, representando uma valiosa fonte de um largo espectro de lipídios que podem ser assimilados por seus consumidores (Renaud *et al.*, 1999; Zhukova & Aizdaicher, 1995). Porém, essa fonte de lipídios pode também ser utilizada não somente pelos tradicionais elos das cadeias tróficas desses ambientes, mas também por animais de interesse comercial na aquicultura, e inclusive o homem. As Chlorophyta, geralmente, têm uma predominância de ácidos graxos insaturados, tais como os C₁₈ FAME 18:2 ω 6 e 18:3 ω 3 (Volkman *et al.*, 1998) embora, pouco ainda se saiba sobre as algas verdes de água doce.

Pelo exposto, neste trabalho nos propomos a considerar, também, as possíveis variações qualitativas ou quantitativas, como variações nas proporções em que ocorrem determinados ácidos graxos nos perfis das diferentes espécies. Tais variações qualitativas e quantitativas são consideradas como “característica diacrítica”.

O conhecimento sobre a composição lipídica das espécies de microalgas verdes da família Selenastraceae se faz necessário, pois existem poucos trabalhos sobre os ácidos graxos dessa família, principalmente em espécies oriundas de regiões tropicais e sub-tropicais, além de fornecer informações de caráter ecológico, como também de valor econômico desses ácidos graxos. Ainda, é também oportuno analisar a composição de outras classes lipídicas da família Selenastraceae considerando-se as poucas informações disponíveis na literatura especializada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção dos perfis de ácidos graxos e outras classes lipídicas de espécies de Selenastraceae, assim como avaliar se há alteração na composição desses lipídios quando analisados em diferentes fases de crescimento dessas microalgas.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das cepas

As cepas de microalgas utilizadas nesse estudo pertencem à Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce (CCMA-UFSCar) do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil, onde são mantidas em condições axênicas de cultivo.

Tabela 2.1 Relação de dezesseis espécies ou cepas da família Selenastraceae utilizadas na obtenção dos perfis lipídicos por GC/MS. Os asteriscos indicam as cepas utilizadas no experimento comparativo entre as fases de crescimentos exponencial e estacionário.

| Cepas | Táxon |
|-----------------|---|
| CCMA-UFSCar 3 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953 |
| CCMA-UFSCar 128 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953* |
| CCMA-UFSCar 239 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953* |
| CCMA-UFSCar 83 | <i>Ankistrodesmus flexuosus</i> (Komárek) Ergashev 1974 |
| CCMA-UFSCar 333 | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953* |
| CCMA-UFSCar 277 | <i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969 |
| CCMA-UFSCar 455 | <i>Chlorolobion braunii</i> (Nägeli) Komárek 1979* |
| CCMA-UFSCar 350 | <i>Curvastrum pantanale</i> T.S. Garcia 2016 |
| CCMA-UFSCar 123 | <i>Kirchneriella aperta</i> Teiling 1912* |
| CCMA-UFSCar 24 | <i>Monoraphidium arcuatum</i> (Korshikov) Hindák 1970 |
| CCMA-UFSCar 306 | <i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová 1969 |
| CCMA-UFSCar 176 | <i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová 1969 |
| CCMA-UFSCar 353 | <i>Monoraphidium komarkovae</i> Nygaard 1979 |
| CCMA-UFSCar 325 | <i>Monoraphidium pseudobraunii</i> (Belcher & Swale) Heynig 1979 |
| CCMA-UFSCar 241 | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866 |
| CCMA-UFSCar 47 | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866* |

Curvas de crescimento das espécies para a obtenção dos perfis e classes lipídicas

Para determinação da curva de crescimento as cepas dos gêneros *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium*, *Selenastrum*, *Kirchneriella*, *Curvastrum* e *Chlorolobion* (Tabela 2.1) foram cultivadas em réplicas em frascos de vidro de 1 L, com volume de 0,8 L de meio de cultivo WC “Wright’s Cryptophyte” (Guillard & Lorenzen, 1972), pH 7,0. As condições de cultivo foram idênticas para todas as espécies: intensidade luminosa de $\sim 300 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro), sob borbulhamento constante de ar comprimido a $0,05 \text{ L}/\text{min}^{-1}$ e sendo os cultivos iniciados com inóculo de 10^4 células/mL, determinados por contagem de células em câmara Fuchs Rosenthal 3.2 (catalog No. 3720, Hausser Scientific, Horsham, PA).

Alíquotas de 10 mL foram retiradas dessas culturas nos 5 primeiros dias consecutivos de cultivo e depois a cada 48 horas, até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento. As curvas de crescimento foram obtidas e expressas pela concentração de clorofila-*a* (Chl-*a*) *in vivo*, determinada por fluorometria em Fluorômetro Turner Trilogy, equipado com módulo Chl-*a in vivo* (Turner Designs, Sunnyvale, CA), em intervalos de amostragem de no máximo 48 horas, até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento.

Cultivos Experimentais para a obtenção dos Perfis e Classes lipídicas.

Após a obtenção das curvas de crescimento e sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente, as dezesseis cepas de Selenastraceae foram inoculadas (trélicas) em frascos de vidro com capacidade para 2 L, volume de 1,8 L de meio de cultivo WC (pH 7.0) e concentração celular inicial de 10^4 células/mL e quantificadas por contagem em câmara Fuchs Rosenthal 3.2 (catalog No. 3720, Hausser Scientific, Horsham, PA).

Ao atingirem metade da fase exponencial de crescimento, de acordo com suas respectivas curvas de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804) a 10°C, 1150 x g durante 10 minutos e em seguida lavadas com meio WC sem a adição de fósforo (P) e nitrogênio (N) para a retirada completa dos sais presentes no meio de cultivo. As células foram então congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas (liofilizador HETO Drywinner), pesadas e armazenadas em freezer a -20°C.

Transesterificação Direta (TD)

A extração de ácidos graxos totais e a conversão para FAMES seguiram o método de Transesterificação Direta (TD) da biomassa (Hartman & Lago, 1973), adaptado para microescala (Antoniosi-Filho, 1995). No método de TD os ácidos graxos são liberados diretamente da biomassa sem a necessidade de homogeneização e extração com clorofórmio e metanol (Griffiths *et al.*, 2010).

Para realizar a TD, duas soluções foram preparadas: a) solução esterificante composta de 2,0 g de cloreto de amônio, 60 mL metanol anidro e 3,0 mL de ácido sulfúrico, feita por refluxo em balão de fundo redondo acoplado a um condensador, durante 15 minutos a 100°C em manta aquecedora (Fisatom modelo 52E – classe 300); b) a solução de 0.5 Molar de metóxido de potássio (CH₃KOH - 2,8 gramas de hidróxido de potássio em 100 mL de metanol anidro). A biomassa algal seca (~50 mg) em *vials* de vidro, recebeu 3 mL da solução de metóxido de potássio e foi aquecida em banho-maria (10 minutos a 90°C) e depois resfriada. Após, recebeu 9 mL de solução esterificante e foi novamente aquecida (10 minutos a 90°C, em banho-maria) e resfriada em banho de gelo. Finalmente, os extratos receberam 5 mL de n-heptano e 2 mL de água destilada, os *vials* foram agitados manualmente até a separação das fases. A fase superior orgânica, contendo os FAMES em n-heptano, foi coletada com uma

pipeta *Pasteur*, colocadas em fracos cromatográficos 1,5 mL e armazenadas em freezer -20°C até as análises de GC/MS.

Os FAMEs foram analisados em cromatógrafo a gás Agilent 7890 acoplado ao Espectrômetro de Massa Agilent 5975 (Agilent Technologies, Inc. USA), com coluna Agilent HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox com dimensões de 30 m x 0.25mm 0.25 µm). As condições cromatográficas foram: energia eletrônica de 70 eV, temperatura da fonte de íons a 230°C e temperatura para a linha de transferência (Thermal aux. 2) a 280°C. Injeções (em réplicas) foram realizadas manualmente através de uma micro-seringa. A temperatura do injetor foi programada para 120°C e o volume de injeção 1µL no modo *splitless*. O gás hélio (5.0 analítico) foi usado como arraste sob pressão de 1.924 *psi* em fluxo total de 15,926 mL/min. A temperatura inicial do forno foi mantida a 70°C durante 10 minutos e em seguida, sob taxa de aquecimento de 5°C/min atingiu 250°C, mantendo-se constante por 15 minutos até o final da análise.

O FAMEs foram identificados pela comparação dos tempos de retenção (T.R) dos padrões internos FAME MIX C8-C24 (Supelco Product number 18918) e seus respectivos espectros de massas através da biblioteca NIST11.L (National Institute of Standards and Technology), do software AMDIS 32 Analysis (Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System) associados aos arquivos de espectros de massas presentes na AOCS “Lipid library” do ScottishCrop Science Research Institute (<http://www.lipidlibrary.com.uk/index.html>).

Para a construção do perfil lipídico foi usada a concentração (%) de cada ácido graxo por réplica (Mooney *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2011; Taipale *et al.*, 2013).

Análises dos Perfis de ácidos graxos nas fases de crescimento

Cultivos experimentais

Para avaliar se alterações no perfil de ácidos graxos das microalgas ocorrem durante as diferentes etapas do seu crescimento, seis cepas de Selenastraceae (Tabela 2.1) foram selecionadas e submetidas a análises de ácidos graxos durante duas fases de crescimento distintas: metade da fase exponencial (EXP) e também no início da fase estacionária (EST), estabelecidas previamente através de curvas de crescimento.

As espécies e algumas cepas de *Ankistrodesmus densus* Korshikov (CCMA-UFSCar 128), *Ankistrodesmus densus* Korshikov (CCMA-UFSCar 239), *Ankistrodesmus fusiformis* Corda ex Korshikov (CCMA-UFSCar 333), *Chlorolobion braunii* (Nägeli) Komárek (CCMA-UFSCar 455), *Kirchneriella aperta* Teiling (CCMA-UFSCar 123) e *Selenastrum bibraianum* Reinsch (CCMA-UFSCar 47) foram inoculadas em 1,8 L de meio WC (pH 7.0), sob as mesmas condições de cultivo.

A obtenção das curvas de crescimento, as condições cromatográficas e a identificação dos FAMES foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Cromatografia de camada fina Iatroscan-Chromarod (TLC).

A Cromatografia de camada fina Chromarod (TLC – Thin-Layer Chromatograph), com a detecção por ionização de chama Iatroscan (FID – Flame Ionization Detector), foi usada para a determinação de classes lipídicas (hidrocarbonetos, ésteres de cera, cetona, ácidos graxos livres, triacilglicerídeos, álcool, esteróis, AMPL, etc.) em espécies e cepas de Selenastraceae, sob condições de cultivo idênticas às usadas para a obtenção dos perfis lipídicos determinados por GC/MS. Esse procedimento foi dividido em três etapas utilizando “Chromarods”, um conjunto de hastes revestidas por quartzo (Parrish, 1987). Esse sistema

utiliza solventes de polaridade crescente para uma completa identificação desses compostos nas amostras, e será descrito a seguir.

Os extratos lipídicos (obtidos pela extração de clorofórmio/metanol e derivatização) foram aplicados às hastes “Chromarods” com o auxílio de uma micro-seringa. Em seguida, as hastes foram concentradas utilizando acetona 100%, por duas vezes. O primeiro sistema de solventes continha uma mistura de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (98.95: 1,0: 0,05), as hastes permaneceram durante 25 minutos nesse sistema e, após esse tempo foram removidas e levadas à câmara de umidade constante por 5 minutos e em seguida escaneadas (leitura por varredura). Após essa etapa, as hastes foram levadas ao segundo sistema de solventes composto por uma mistura de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (79:20:1), onde permaneceram durante 40 minutos, e depois foram escaneadas. O terceiro sistema subdividiu-se em duas etapas, a primeira foi desenvolvida em acetona 100% durante dois períodos de 15 minutos, e então, mais dois períodos de 10 minutos em clorofórmio: metanol: “água de extração” (água extraída com clorofórmio em funil de separação, *overnight*) (5:4:1), em seguida foram secas durante 5 minutos na Iatroscan e, tiveram todo o seu comprimento escaneado novamente. Antes de cada utilização dos sistemas de solventes, as hastes permaneceram durante 5 minutos em câmara de umidade constante. As Chromarods foram calibradas utilizando padrões de Sigma Chemicals (Sigma Chemicals, St. Louis, MI, EUA), e a identificação por Flame Ionization Detector (FID) das classes lipídicas nas amostras foram feitas a partir de curvas de calibração utilizando esses padrões.

Análise estatística

Os ácidos graxos das cepas, para cada fase de crescimento, tiveram suas médias comparadas utilizando o teste t pareado. As diferenças significativas entre cada FAME para cepa entre as fases de cultivo foram observadas para valores de $p \leq 0,05$.

2.5. RESULTADOS

Curvas de crescimento das Selenastraceae para a determinação dos Perfis e Classes lipídicas.

A cepa *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83) atingiu a metade da fase exponencial de crescimento no 17º dia de cultivo, *A. densus* (CCMA-UFSCar 3), *A. densus* (CCMA-UFSCar 128), *A. densus* (CCMA-UFSCar 239), *A. stipitatus* (CCMA-UFSCar 277), *M. contortum* (CCMA-UFSCar 306), *M. griffithii* (CCMA-UFSCar 176), *C. pantanale* (CCMA-UFSCar 350), *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 241), *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 47), *K. aperta* (CCMA-UFSCar 123), *C. braunii* (CCMA-UFSCar 455) atingiram essa fase de crescimento no 15º dia após serem inoculadas, *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353), *M. pseudobraunii* (CCMA-UFSCar 325), *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 333) no 13º dia e a cepa e *M. arcuatum* (CCMA-UFSCar 24) após 10 dias de cultivo.

Curvas de crescimento para análises entre as fases de cultivo

Tabela 2.2 Relação de Selenastraceae e seus respectivos dias de cultivo em fases de crescimento exponencial e estacionário, dados baseados em curvas de crescimento celular para cada cepa.

| Táxon | | Cultivo (dias) | |
|----------------------|-------------------|----------------|--------------|
| | | Exponencial | Estacionária |
| <i>A. densus</i> | (CCMA-UFSCar 128) | 15 | 25 |
| <i>A. densus</i> | (CCMA-UFSCar 239) | 15 | 25 |
| <i>A. fusiformis</i> | (CCMA-UFSCar 333) | 15 | 25 |
| <i>C. braunii</i> | (CCMA-UFSCar 455) | 15 | 25 |
| <i>K. aperta</i> | (CCMA-UFSCar 123) | 15 | 28 |
| <i>S. bibraianum</i> | (CCMA-UFSCar 47) | 10 | 23 |

Perfil dos FAMES das Selenastraceae

Doze ácidos graxos na forma de metil éster foram encontrados entre as cepas de Selenastraceae analisadas: C14:0, C16:3 ω 6, C16:4 ω 3, C16:2 ω 6, C16:3 ω 3, C16:1 ω 9, C16:0, C18:4 ω 6, C18:3 ω 6, C18:2 ω 6, C18:3 ω 3 e C18:0 (Tabela 2.3). Dentre eles, os ácidos graxos considerados como indicadores para a família Selenastraceae, os C₁₈ 18:3 ω 3 e 18:4 ω 6, como apresentado no capítulo 1. O ácido α -linolênico (C18:3 ω 3) esteve presente em todas as cepas analisadas, e em média, variou de 37% em *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 47) a 55% em *A. stipitatus* (CCMA-UFSCar 277), sendo este o FAME mais abundante encontrado em todas as Selenastraceae analisadas. O segundo FAME mais abundante e também comum a todas foi o ácido palmítico (C16:0), que variou entre 19% em *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353) e 41% em *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83). Os ácidos graxos linoleico (C18:2 ω 6) e o C18:4 ω 6 também foram encontrados em todas as cepas de Selenastraceae, porém em concentrações de 3% em *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83) a 9% em *M. contortum* (CCMA-UFSCar 306) e de 1,4% em *C. pantanale* (CCMA-UFSCar 350) a 7% *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 306), respectivamente.

Os demais FAMES não ocorreram em todas as cepas estudadas. O ácido mirístico (C14:0) foi encontrado na maioria das Selenastraceae em concentrações traço ($\leq 1\%$) e apenas nas cepas de *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 241 e CCMA-UFSCar 47) variou de 3,5% a 5,5%.

Todas as cepas pertencentes ao gênero *Monoraphidium* apresentaram um percentual do FAME C16:3 ω 6 entre 0,8 a 5% em *M. contortum* (CCMA-UFSCar 306) e *M. griffithii* (CCMA-UFSCar 176), respectivamente. O FAME C16:4 ω 3 ocorreu entre 3,7% em *M. griffithii* (CCMA-UFSCar 176) e 17% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 128), o C16:2 ω 6, encontrado na maioria das cepas, variou de 0,5% em *M. pseudobraunii* (CCMA-UFSCar 325) a 1,9% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 239), com exceção em *K. aperta* (CCMA-UFSCar

123). O C16:3 ω 3 variou de 1% em *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 333) a 5% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 239) e o C16:1 ω 9 variou de 0,3% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 3) a 2,4 % em *M. contortum* (CCMA-UFSCar 306).

O ácido γ -linolênico (C18:3 ω 6) foi o FAME que ocorreu apenas em cinco cepas de Selenastraceae, e sua concentração oscilou entre 0,4% em *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83) e 0,7% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 239). Por último, o ácido esteárico (C18:0) foi encontrado de 0,3% em *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353) a 3% em *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83).

Na espécie tipo, do novo gênero de Selenastraceae recém-descrito, *Curvastrum pantanale* (CCMA-UFSCar 350) foram encontrados os FAMES C14:0, C16:4 ω 3, C16:2 ω 6, C16:3 ω 3, C16:0, C18:4 ω 6, C18:2 ω 6, C18:3 ω 3 e C18:0 (Tabela 2.2).

Tabela 2.3 Perfil dos FAMEs de dezesseis cepas pertencentes à família Selenastraceae analisadas por cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC/MS)

| CEPAS / FAME'S % | C14:0 | C16:3 ω6 | C16:4 ω3 | C16:2 ω6 | C16:3 ω3 | C16:1ω9 | C16:0 | C18:4 ω6 | C18:3ω6 | C18:2ω6 | C18:3 ω3 | C18:0 |
|---|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| <i>A. densus</i> (CCMA-UFSCar 3) | 0,589 ± 0,09 | 0 | 0 | 1,796 ± 0,18 | 4,689 ± 0,64 | 0,277 ± 0,29 | 28,028 ± 0,20 | 5,344 ± 0,21 | 0,61 ± 0,03 | 5,149 ± 0,21 | 52,181 ± 1,16 | 0,553 ± 0,18 |
| <i>A. densus</i> (CCMA-UFSCar 128) | 0,593 ± 0,11 | 0 | 17,358 ± 8,64 | 1,234 ± 0,72 | 1,613 ± 1,95 | 0,755 ± 0,09 | 22,074 ± 3,12 | 3,99 ± 0,57 | 0 | 8,626 ± 0,65 | 44,434 ± 2,99 | 0 |
| <i>A. densus</i> (CCMA-UFSCar 239) | 0,384 ± 0,03 | 0 | 0 | 1,898 ± 0,26 | 5,061 ± 0,26 | 0,917 ± 0,03 | 28,511 ± 1,06 | 4,423 ± 0,17 | 0,71 ± 0,01 | 6,46 ± 0,72 | 51,359 ± 0,25 | 0,553 ± 0,08 |
| <i>A. flexuosus</i> (CCMA-UFSCar 083) | 0,498 ± 0,03 | 0 | 0 | 0,723 ± 0,03 | 1,485 ± 0,19 | 0 | 41,055 ± 1,51 | 1,538 ± 0,15 | 0,407 ± 0,04 | 2,994 ± 0,50 | 47,438 ± 1,08 | 3,124 ± 0,62 |
| <i>A. fusiformis</i> (CCMA-UFSCar 333) | 0,422 ± 0,01 | 0 | 5,645 ± 0,05 | 1,252 ± 0,01 | 0,958 ± 0,06 | 0,832 ± 0,06 | 29,456 ± 0,34 | 2,722 ± 0,15 | 0,477 ± 0,02 | 5,294 ± 0,13 | 51,775 ± 0,05 | 1,176 ± 0,07 |
| <i>A. stipitatus</i> (CCMA-UFSCar 277) | 0,480 ± 0,02 | 0 | 5,426 ± 0,02 | 1,284 ± 0,01 | 4,028 ± 0,01 | 0,718 ± 0,01 | 23,311 ± 0,28 | 4,9 ± 0,02 | 0 | 3,605 ± 0,02 | 55,483 ± 0,20 | 0,71 ± 0,03 |
| <i>C. braunii</i> (CCMA-UFSCar 455) | 0 | 0 | 13,61 ± 0,09 | 1,394 ± 0,35 | 2,087 ± 0,37 | 0 | 23,569 ± 1,70 | 3,748 ± 0,60 | 0 | 7,822 ± 0,70 | 45,697 ± 2,74 | 0 |
| <i>K. aperta</i> (CCMA-UFSCar 123) | 0 | 0 | 9,123 ± 0,01 | 0 | 2,612 ± 0,03 | 0 | 31,417 ± 2,09 | 3,19 ± 0,26 | 0 | 3,941 ± 1,45 | 49,713 ± 0,34 | 0 |
| <i>M. arcuatum</i> (CCMA-UFSCar 24) | 0,623 ± 0,03 | 1,739 ± 0,07 | 9,005 ± 0,07 | 1,313 ± 0,07 | 1,468 ± 0,01 | 0,984 ± 0,01 | 26,343 ± 0,11 | 4,733 ± 0,12 | 0 | 5,02 ± 0,63 | 48,092 ± 0,38 | 0,791 ± 0,04 |
| <i>M. contortum</i> (CCMA-UFSCar 306) | 0,668 ± 0,03 | 0,861 ± 0,02 | 12,527 ± 0,05 | 0,965 ± 0,01 | 1,539 ± 0,01 | 2,378 ± 0,02 | 22,244 ± 0,02 | 4,402 ± 0,01 | 0,418 ± 0,02 | 9,558 ± 0,03 | 43,983 ± 0,10 | 0,52 ± 0,06 |
| <i>M. griffithii</i> (CCMA-UFSCar 176) | 0,515 ± 0,03 | 5,210 ± 0,01 | 3,766 ± 0,02 | 1,377 ± 0,01 | 0 | 0,84 ± 0,08 | 24,565 ± 0,03 | 5,85 ± 0,04 | 0 | 4,29 ± 0,22 | 53,018 ± 0,14 | 0,581 ± 0,04 |
| <i>M. kormakovae</i> (CCMA-UFSCar 353) | 0,434 ± 0,05 | 2,402 ± 0,14 | 13,322 ± 0,29 | 0,626 ± 0,03 | 1,282 ± 0,02 | 1,736 ± 0,07 | 19,597 ± 0,42 | 6,922 ± 0,28 | 0 | 5,462 ± 0,90 | 47,641 ± 0,54 | 0,361 ± 0,04 |
| <i>M. pseudobraunii</i> (CCMA-UFSCar 325) | 0,295 ± 0,01 | 1,204 ± 0,02 | 12,286 ± 0,13 | 0,573 ± 0,01 | 1,382 ± 0,02 | 2,343 ± 0,05 | 22,443 ± 0,24 | 4,477 ± 0,08 | 0 | 3,841 ± 1,22 | 50,356 ± 0,71 | 0,561 ± 0,08 |
| <i>S. bibraianum</i> (CCMA-UFSCar 47) | 5,595 ± 0,22 | 0 | 12,154 ± 0,25 | 0,812 ± 0,09 | 0 | 0 | 35,832 ± 0,38 | 2,356 ± 0,10 | 0 | 4,643 ± 0,31 | 37,45 ± 0,75 | 1,227 ± 0,16 |
| <i>S. bibraianum</i> (CCMA-UFSCar 241) | 3,501 ± 1,21 | 0 | 13,830 ± 0,77 | 1,107 ± 0,40 | 0 | 0 | 24,51 ± 2,05 | 3,812 ± 0,21 | 0 | 8,783 ± 0,29 | 41,952 ± 0,74 | 0,706 ± 0,14 |
| <i>C. pantanale</i> (CCMA-UFSCar 350) | 0,366 ± 0,02 | 0 | 9,357 ± 0,93 | 0,611 ± 0,06 | 1,479 ± 0,10 | 0 | 26,419 ± 0,86 | 1,413 ± 0,45 | 0 | 4,16 ± 0,89 | 54,338 ± 1,76 | 1,64 ± 0,17 |

As cepas de Selenastraceae apresentaram composições similares quanto ao grau de insaturação dos ácidos graxos (Figura 2.1) em seus perfis. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) foram predominantemente elevados em todas as cepas, a menor concentração dos PUFAs foi encontrada em *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83) com 55% e a maior em *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353) com 78%. Os ácidos graxos monossaturados (MUFAs) ocorreram em algumas cepas e em baixas concentrações, que variaram de 0,5% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 3) a 2,5% em *M. contortum* (CCMA-UFSCar 306). Os ácidos graxos saturados (SFA) abrangeram todas Selenastraceae, ocorrendo de 20% a 45%, em média, nas cepas *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353) e *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83) respectivamente.

Perfil lipídico das fases de crescimento exponencial e estacionária

Foram encontradas alterações significativas de sete ácidos graxos presentes em três das seis cepas de Selenastraceae analisadas nas fases de cultivo exponencial (EXP) e estacionária (EST) (Tabela 2.4).

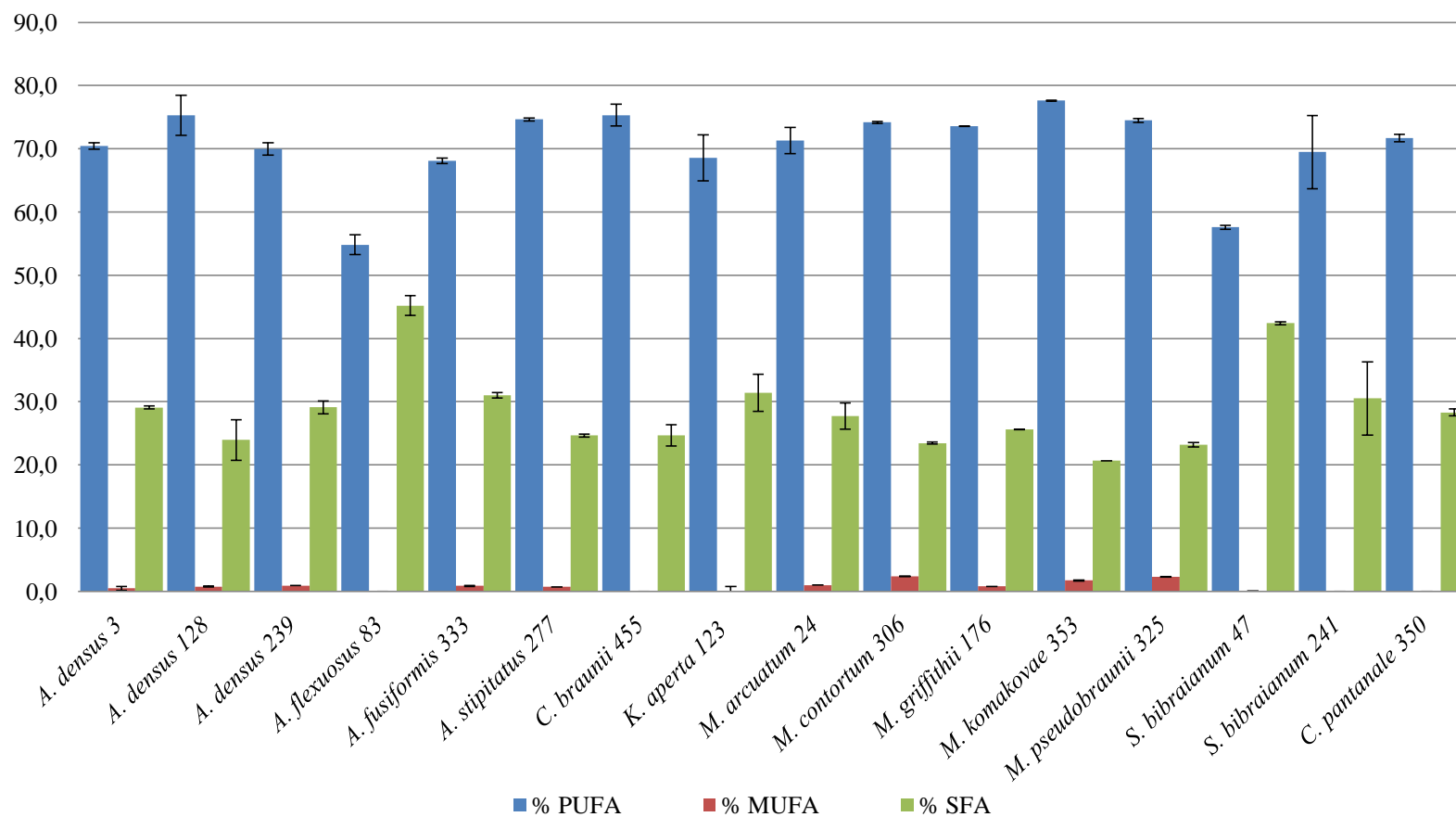


Figura 2-1 Resultado da somatória dos ácidos graxos (%) por grau de insaturação: ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácidos graxos monossaturados (MUFA) e ácidos graxos saturados (SFA) das cepas de Selenastraceae.

Tabela 2-4: Perfil dos ácidos graxos que apresentaram ou não diferenças significativas de concentração entre as fases de cultivo exponencial e estacionária de microalgas pertencentes à família Selenastraceae cultivadas nas fases: exponencial (EXP) e estacionária (EST). As análises foram realizadas por cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC/MS). As diferenças significativas entre cada tipo de FAME para cada cepa consideraram os valores de $p \leq 0,05$ (- não ocorreram alterações significativas)

| FAME'S % | EXP | EST | EXP | EST | EXP | EST | EXP | EST | EXP | EST | EXP | EST | EXP | EST |
|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|
| | C14:0 | C14:0 | C16:4 ω 3 | C16:4 ω 3 | C16:0 | C16:0 | C18:2 ω 6 | C18:2 ω 6 | C18:3 ω 3 | C18:3 ω 3 | C18:1 ω 9 | C18:1 ω 9 | C18:0 | C18:0 |
| <i>C. braunii</i> 455 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>K. aperta</i> 123 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>A. fusiformis</i> 333 | - | - | 4,9 \pm 0,28 | 3,0 \pm 0,20 | - | - | - | - | 34,67 \pm 3,60 | 0,000 | 0,000 | 36,57 \pm 0,91 | 1,0 \pm 0,23 | 1,82 \pm 0,19 |
| <i>S. bibrainum</i> 47 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>A. densus</i> 239 | - | - | - | - | - | - | - | - | 47,44 \pm 0,20 | 53,90 \pm 2,27 | - | - | - | - |
| <i>A. densus</i> 128 | 0,61 \pm 0,02 | 0,38 \pm 0,01 | - | - | 34,68 \pm 1,82 | 24,05 \pm 0,82 | 4,65 \pm 0,36 | 7,40 \pm 0,33 | - | - | - | - | - | - |

C. braunii (CCMA-UFSCar 455), *K. aperta* (CCMA-UFSCar 123) e *S. bibrainum* (CCMA-UFSCar 47) não apresentaram alterações significativas nos conteúdos lipídicos de seus perfis, quando avaliadas em fases de crescimento distintas. A espécie *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 333) apresentou diferenciações significativas no conteúdo dos FAMES C16:4 ω 3, C18:3 ω 3, C18:1 ω 9 e C18:0. O FAME C16:4 ω 3 apareceu em maior concentração na fase EXP de cultivo (4,9%), enquanto o C18:0 foi maior na fase EST (1,8%), ambas as variações foram consideradas significativas ($p \leq 0,05$) (Tabela 2.4). Para os FAMES C18:3 ω 3 e C18:1 ω 9, as diferenças nos conteúdos foram consideradas muito significativas entre as fases para *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 333). O C18:3 ω 3 alcançou 34,6% do total dos FAMES na fase de cultivo EXP e esteve ausente na fase de cultivo EST. O mesmo foi notado para o ácido oleico (C18:1 ω 9) porém, esse FAME só ocorreu na fase EST (36,6%) de crescimento.

A cepa de *A. densus* (CCMA-UFSCar 239) manteve seus perfis lipídicos praticamente iguais entre as fases de crescimento, exceto pelo FAME C18:3 ω 3 que atingiu na fase EST de crescimento um percentual significativamente maior (54%) do que no cultivo em fase EXP. Entretanto, a cepa *A. densus* (CCMA-UFSCar 128) foi a que mais apresentou alterações no teor de seus ácidos graxos, o FAME C14:0, embora sua ocorrência seja considerada como valor traço ($\leq 1\%$), se mostrou em maior concentração na fase EXP de cultivo. O ácido palmítico (C16:0), também esteve presente em maior concentração no período de crescimento EXP, quase 35% do total de ácidos graxos presentes na microalga e o FAME C18:2 ω 6 aumentou seu percentual de 4,6% para 7,4% na fase EST de cultivo (Tabela 2.4).

Classes lipídicas

Dentre as classes lipídicas encontradas para Selenastraceae destacaram-se os fosfolipídios, que foram abundantes na maioria das espécies analisadas e variaram de 5,3% na cepa *A. densus* (CCMA-UFSCar 239) a 58,2% em *A. stipitatus* (CCMA-UFSCar 277) (Figura 2.2). Os lipídios polares também apresentaram percentual elevado nas espécies, e variaram de 19,7% em *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353) a 31,7 em *K. aperta* (CCMA-UFSCar 123). Em seguida, os esteróis foram a terceira classe lipídica mais abundante entre as Selenastraceae, com 7,9% em *A. arcuatum* (CCMA-UFSCar 24) e 13,4% em *C. braunii* (CCMA-UFSCar 455).

Os álcoois estiveram presentes em todas as espécies em concentrações que foram de 0,6% em *C. pantanale* (CCMA-UFSCar 350) a 5% em *M. griffithii* (CCMA-UFSCar 176). A quantidade dos ácidos graxos livres variou entre as espécies de Selenastraceae, sendo que a espécie *M. arcuatum* (CCMA-UFSCar 24) continha 3,8% e *C. braunii* (CCMA-UFSCar 455) 27,7% dessa classe lipídica. As concentrações de triacilglicerídeos (TAG) foram encontradas em todas as espécies, variando de 0,8% em *K. aperta* (CCMA-UFSCar 123) até 16% em *A. densus* (CCMA-UFSCar 239).

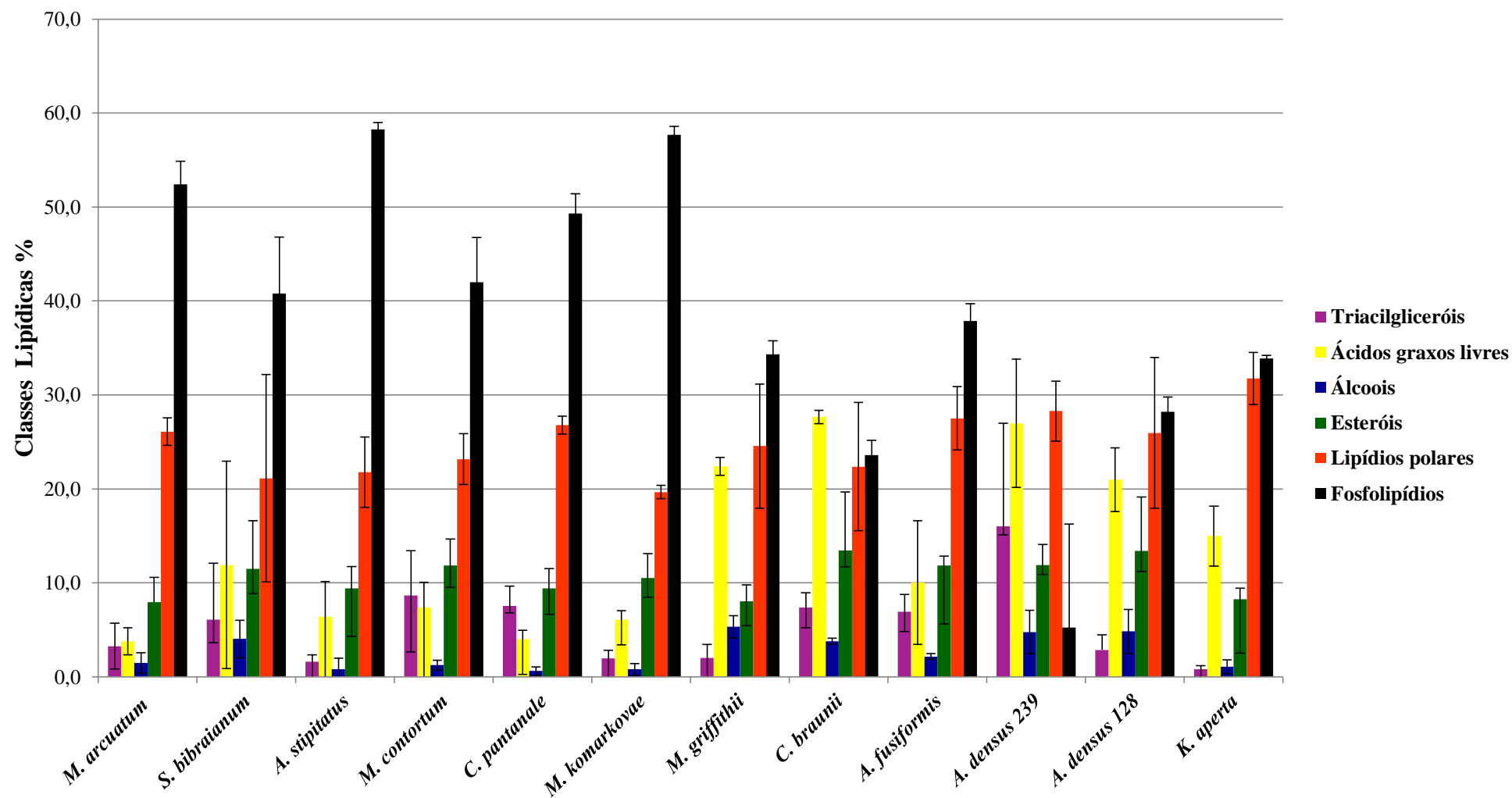


Figura 2-2 Concentrações relativas (%) das classes lipídicas encontradas a partir do fracionamento dos ácidos graxos de doze espécies de Selenastraceae. As análises foram realizadas por Cromatografia de camada fina Iatroscan-chromarod (TLC – Thin-Layer Chromatograph).

2.6. DISCUSSÃO

As doze variedades de ácidos graxos encontrados entre as cepas das Selenastraceae apresentam semelhanças, seja na composição ou no percentual, a outros trabalhos encontrados na literatura para alguns gêneros de Selenastraceae (Aakanksha *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012; Menezes *et al.*, 2013; Taipale *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016; Yee *et al.*, 2016) e para a classe Chlorophyceae (Lang *et al.*, 2011). Contudo, resultados sobre a prospecção lipídica exclusivamente oriunda de Selenastraceae como os nossos são ainda escassos.

Às Chlorophyceae é atribuída uma variedade de ácidos graxos que apresentam de 16 a 18 carbonos, saturados e insaturados (Basova, 2005; Pratoomyot *et al.*, 2005). Para nós, os ácidos graxos saturados C16:0, C14:0 e C18:0, somados representaram de 20% a 45% do total do ácidos graxos em Selenastraceae, sob as condições de cultivos aqui estabelecidas. Estes valores estão de acordo com os encontrados por Dunstan *et al.* (1992) em espécies de Chlorophyceae. Contudo, em nossos perfis, prevaleceu majoritariamente o FAME C16:0, porém em teores menores aos encontrados na literatura para Selenastraceae em cultivos suplementados por CO₂ ou, ainda, em cultivos subsidiados por águas de efluentes industriais (Yee *et al.*, 2016).

Harwati *et al.* (2012), ao analisarem o acúmulo de ácidos graxos em cepas de *Chlorococum* sp. (Chlorophyceae) gênero tropical de água doce, encontraram um perfil lipídico abundante de FAMES C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, e concluíram que essas cepas apresentavam grande potencial como recurso alimentar, para a produção de cosméticos e biocombustíveis. Perfil semelhante ao descrito por nós para Selenastraceae, exceto pela ausência do FAME C18:1, confirmando, a partir desses dados, que as Selenastraceae apresentam mais de um tipo de ácidos graxos de potencial econômico. Yu *et al.* (2012), também visando obter matéria prima para a produção de biocombustíveis, ao utilizarem cepas

do gênero *Monoraphidium*, reportaram elevados teores dos ácidos α -linolênico (C18:3 ω 3) e palmítico (C16:0) em suas cepas, assim como nossos achados para os principais ácidos graxos encontrados nas Selenastraceae. Menezes *et al.* (2013), encontraram para cepas de *Monoraphidium komarkovae*, *Kirchineriella irregulares* e *Kirchineriella lunaris*, proporções do FAME C16:0 entre 24,7% a 35,6%, confirmando o percentual obtido por nós para esse mesmo FAME. Por fim, Yee *et al.* (2016), concluíram que os gêneros *Monoraphidium* e *Ankistrodesmus* apresentavam potencial para a produção de biocombustíveis, assim como os demais autores, devido à alta produção de biomassa das Selenastraceae, porém ressaltaram que para atender as demandas e normas de produção de biodiesel atuais, essas cepas necessitariam de modificação nas condições de cultivos para obter mais conteúdo de ácidos monossaturados, tal como o ácido oleico (C18:1 ω 9).

As concentrações de ácidos graxos monossaturados encontradas entre as Selenastraceae no presente estudo, em geral, estiveram abaixo dos estimados por outros autores, principalmente em relação ao ácido oleico (C18:1), que é diretamente relacionado à qualidade do biodiesel produzido a partir da biomassa de microalgas, devido à sua alta estabilidade oxidativa e viscosidade, permitindo maiores períodos de armazenamento e o não entupimento dos filtros em motores em regiões frias (Milano *et al.*, 2016), sendo por isso mais adequados para produção de biocombustíveis. Entretanto, nas condições de cultivos estabelecidas por nós neste estudo, nenhuma cepa apresentou tal ácido graxo.

A associação entre os altos níveis de ácidos graxos saturados, como o C16:0 e a taxa de crescimento de larvas de *Crassostrea gigas* foi observada por Thompson *et al.* (1992), estes autores demonstraram que a dieta baseada em ácidos graxos saturados era mais eficiente do que a baseada em ácidos graxos insaturados. Este fato agrega ainda mais valor aos resultados obtidos por nós para as cepas de Selenastraceae, uma vez que todas apresentaram tal FAME em altas concentrações, especialmente a cepa *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83)

cujo o teor de ácido palmítico C16:0 ultrapassa 40%, expandindo a aplicabilidade dessas microalgas como alimento em potencial para a maricultura, e ainda, podendo ter seus ácidos graxos transferidos para níveis tróficos mais elevados através do zooplâncton como intermediários (Brown *et al.*, 1996).

O ácido mirístico (C14:0), presente em concentrações tidas como traço em nossas cepas, não foi descrito por Yee *et al.* (2016) para Selenastraceae, porém foi citado por Selvarajan *et al.* (2015) para a classe Chlorophyceae. A concentração deste FAME em maior teor é característico nas classes Prymnesiophyceae e Bacillariophyceae (20% - 32,7%) (Basova, 2005; Taipale *et al.*, 2013).

Os SC-PUFAs (cadeia curta) como o ácido α -linolênico (C18:3 ω 3) aparecem em diversos trabalhos como sendo um dos mais abundantes e importantes ácidos graxos presentes nas microalgas (Taipale *et al.*, 2013). Juntamente com ácido linoleico C18:2 ω 6, são chamados de ácidos graxos essenciais, importantes para a regulação das funções biológicas, e precursores dos ácidos eicosapentaenóico (EPA - C20:5 ω 3) + docosahexaenóico (DHA - C22:6 ω 3) e do ácido araquidônico (ARA - C20:4 ω 6), respectivamente. Tais ácidos graxos são diretamente relacionados à prevenção e tratamento de inúmeras doenças humanas, como as do coração ou inflamações e são conhecidos por LC-PUFAs ou ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (Arts *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002; Wen & Chen, 2003).

Os SC-PUFAs 18:3 ω 3 e C18:2 ω 6 são dominantes em quase todas as espécies de microalgas (Basova, 2015), com exceção das Diatomáceas e Eustigmatophyceae (Volkman *et al.*, 1989). A predominante concentração desses SC-PUFAs presentes em nossas cepas de Selenastraceae foram similares aos valores apresentados para as cepas (não Selenastraceae) de *Chlorococcum* sp. (79%), *Chlorella* sp. (66%) e *Scenedesmus* sp. (63%) (Jena *et al.*, 2012). Em estudos quimiotaxonômico, esses ácidos graxos aparecem como indicadores para a família Selenastraceae, como discutido no Capítulo 1, comprovando aqui a diversa gama de

aplicações que os ácidos graxos presentes nas microalgas possuem, sejam em aspectos econômicos, ou principalmente, em aspectos ecológicos.

Os LC-PUFAs EPA, DHA e ARA não foram detectados entre os perfis de nossas cepas. Em compensação, as cepas apresentaram o ácido graxo poli-insaturado C16:4 ω 3 (3,7 a 17%) considerado útil em aplicações “nutracêuticas”, ou seja, um nutriente utilizado com aplicações farmacêuticas (Jena *et al.*, 2012), com exceção de algumas cepas *Ankistrodesmus*.

A fase de crescimento é uma das variáveis ambientais que podem afetar a quantidade e qualidade dos ácidos graxos em microalgas (Dunstan *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997). Em fases com baixa taxa de crescimento, como a fase estacionária, há um maior acúmulo de lipídios neutros, tais como os triacilglicerídeos (TAG) devido à diminuição de nutrientes e depleção de nitrato (Hodgson *et al.*, 1991). Culturas que estão em plena divisão celular possuem menos TAG e mais classes lipídicas estruturais (fosfolipídios, por exemplo). Quando algumas cepas de Selenastraceae tiveram seus ácidos graxos analisados em fases de crescimento distintas, diferenciações significativas, entre alguns de seus ácidos graxos individuais ocorreram. Mansour *et al.* (2003), também encontraram variações no conteúdo dos ácidos graxos em cepas de Dinophyceae, maximizando a produção do ácido docoheptaenóico (DHA) em fase estacionária de cultivo, comprovando que as fases de crescimento podem ser manipuladas para a produção de ácidos graxos específicos.

Os resultados obtidos para *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 333), cepa que apresentou a maior diferença entre os perfis analisados entre fases de crescimento distintas, em virtude da modificação do ácido α -linolênico 18:3 ω 3 (35%) para o oleico 18:1 ω 9 (37%), sugerem que houve diminuição no número de insaturação dos ácidos graxos da fase crescimento exponencial para a estacionária. Segundo Dunstan *et al.* (1993) as microalgas tendem a produzir mais ácidos graxos saturados e monossaturados e, ainda apresentam um maior

percentual de triacilglicerídeos na fase de crescimento estacionária, enquanto no crescimento exponencial elas tendem a apresentar mais ácidos graxos poli-insaturados (lipídios polares).

A cepa de *A. densus* (CCMA-UFSCar 239) teve o maior teor de C18:3 ω 3 e a *A. densus* (CCMA-UFSCar 128) o maior teor de C16:0 durante a fase exponencial de crescimento, essas alterações podem ocorrer também em decorrência de mudanças na composição do meio de cultivo com o passar do tempo, ou seja, com o crescimento das culturas o conteúdo de nitrogênio (N) e fósforo (P) presentes no meio são consumidos, causando um stress nutricional, ou mesmo a limitação de luz pode mudar a composição dos ácidos graxos. Song *et al.* (2014) notaram o aumento no conteúdo dos FAMES C18:2 e C18:3 quando as microalgas foram submetidas a privação de nitrogênio (N) no meio de cultivo, o que explicaria as alterações no percentual das demais cepas analisadas sob fases de crescimento diferentes.

Os triacilglicerídeos são ricos em ácidos graxos (saturados e/ou monoinsaturados), e aparecem na literatura como sendo de grande interesse para a produção de biocombustíveis (Soares, 2012) e, assim como descrito para os ácidos graxos livres (FFA), os triacilglicerídeos (TAG) também podem indicar estresse celular (Parrish, 1988). As microalgas são umas das principais fontes de triacilglicerídeos nos ambientes aquáticos e são responsáveis pela base da cadeia alimentar desses ambientes (Parrish, 1988). O baixo conteúdo de triacilglicerídeo encontrado entre as cepas aqui utilizadas indica que não houve estresse durante o período de cultivo de nossas cepas para a determinação dos perfis e das classes lipídicas, o meio de cultura forneceu nutrientes suficientes para o crescimento das culturas até as análises.

Os lipídios polares em geral presentes nas Selenastraceae mostraram que as cepas estavam em plena divisão celular (citocinese) quando tiveram seus ácidos graxos analisados o que conduziu as Selenastraceae a produzirem mais ácidos graxos poli-insaturados ao invés dos monossaturados e saturados. As frações dos fosfolipídios, principais componentes das

membranas celulares, estão ativamente envolvidos no mecanismo de fotossíntese (Parrish, 1988), entre as classes lipídicas encontradas para as Selenastraceae, em condições normais de cultivos, foram majoritariamente mais elevados em todas as cepas. A segunda classe lipídica mais abundante encontrada nas Selenastraceae foi a AMPL (conjunto de glicolipídios eluídos em acetona juntamente aos monoacilglicerol e pigmentos, do inglês “acetone mobile polar lipid”), sendo essa considerada uma subcategoria dos lipídios polares, somando-se aos fosfolipídios (Ferreira *et al.*, 2013; Parrish, 2013).

Os ácidos graxos livres e os esteróis ocorrem em menores concentrações nas microalgas, e juntas essas classes (ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis e ceras) costumam representar em torno de 10% do total lipídico (Dunstan *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007). Para as Selenastraceae estudadas observou-se que a classe de esteróis representou em torno de 10% porém, os ácidos graxos livres em algumas das cepas analisadas apresentaram percentuais duas vezes maiores do que os citados na literatura.

O crescimento de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. A composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie algal por fatores como a intensidade luminosa, temperatura, pH, nutrientes e concentração de CO₂ (Miao e Wu, 2004).

Portanto, o conhecimento sobre o comportamento fisiológico e bioquímico das microalgas sob diversas condições de cultivos, pode auxiliar a produção de metabólitos específicos e ainda aumentar o rendimento e a qualidade dos cultivos, segundo a necessidade de aplicação.

2.7. CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta dados inéditos sobre os principais ácidos graxos e a classes lipídicas presentes em espécies da família Selenastraceae, e ainda o perfil lipídico de um novo gênero recém-descrito, *Curvastrum*.

Os ácidos graxos presentes nas espécies, sob as condições de cultivos descritas nesse artigo, possuem segundo a literatura consultada, elevados interesse comercial e que tornam essas espécies da família Selenastraceae potencialmente utilizáveis em diversas aplicações ou em estudos de escopo ecológico, tal como a utilização desses mesmos ácidos graxos como indicador de família taxonômica.

Todas as cepas por nós utilizada apresentaram em seu perfil lipídico um alto teor do FAME C16:0 em fase de crescimento exponencial, principalmente a cepa *Ankistrodesmus flexuosus* (CCMA-UFSCar 83) que pode ser utilizada como fonte alimentar para animais na aquicultura ou maricultura. No geral, maioria as cepas apresentaram também uma concentração de ácidos graxos tido como essenciais para a alimentação humana, como os PUFAs C18:3 ω 3, C18:2 ω 6 e C16:4 ω 3.

Outro fator constatado por foi a possibilidade de manipulação do conteúdo lipídico destas espécies. Quando alterados um ou mais fatores nos cultivos destas microalgas, poderá ocorrer também uma alteração no tipo e/ou no conteúdo dos ácidos graxos produzido por elas. A cepa *Ankistrodesmus fusiformis* (CCMA-UFSCar 333) apareceu como uma das alternativas para a produção de biocombustíveis, por ter apresentando o MUFA C18:1 ω 9 na fase de crescimento estacionário.

Por fim, a partir dos resultados obtidos para essa família, pode-se agregar conhecimento sobre os tipos de ácidos graxos e suas respectivas frações lipídicas, como também expandir ainda mais o conhecimento sobre a ecologia, fisiologia e taxonomia dessa extensa família de microalgas.

2.8. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos: 2011/50054-4 e 2013/03979-8) pelo apoio financeiro e científico e bolsas de estudo concedidas, e ao Ocean Sciences Centre at the Memorial University of Newfoundland, principalmente ao Dr. Parrish, pela oportunidade de estágio e análises das classes lipídicas por TLC.

2.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aakanksha, S. G., & Ramachandra, T. V. (2010). Diversity of lipids in algae. *Wetlands, Biodiversity and Climate Change*.
- Antoniosi-Filho N. R. (1995). Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais. *PhD dissertation*. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, p. 339.
- Arts, M. T., Ackman, R. G., & Holub, B. J. (2001). " Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 58, p. 122-137.
- Barceló-Coblijn, G., & Murphy, E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n- 3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n- 3 fatty acid levels. *Progress in lipid research*, 48, p.355-374.
- Basova, M. M. (2005). Fatty acid composition of lipids in microalgae. *International Journal on Algae*, 7. (1).
- Brown, M.T., Dunstan, G. A., Norwood, S. J., & Miller, K. A. (1996). Effects of stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 32, p. 64-73.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M. & Garland, C. D. (1993). Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5, p. 71-83.

- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Jeffrey, S. W. & Barret, S. M. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 161, p. 115-134.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., & Labarta, U. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83, p. 17-37.
- Ferreira, S. P., Souza-Soares, L. D., & Costa, J. A. V. (2013). Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Revista de Ciências Agrárias*, 36(3), 275-287.
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. & Herrero, C. (1998). Effect of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition lipids classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochysis galbana*. *Aquaculture*, 166, p.105-166.
- Griffiths, M. J., Van Hille, R. P., Harrison, S. T. L. (2010). Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. *Lipids*, 45, p.1053-1060.
- Guillard, R. R. L. & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *J. Phycol.* 8, p. 10-14.
- Hartman, L. & Lago R. A. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters form lipids. *Laboratory Practice*, 22, p . 475- 97.

- Harwati, T. U., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresource technology*, 121, p. 54-60.
- Hixson, S. M. Parrish, C. C., Anderson, D. M. (2013). Effect of replacement of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil on growth, lipid class and fatty acid composition of farmed juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiol. Biochem.* 39, p.1441–1456.
- Hodgson, P. A., Herderson, R. J., Sargent, J. R. & Leftley, J. W. (1991). Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture: I, The growth cycle. *J. Appl. Phycol.* 3, p. 169-181.
- Jena, J., Nayak, M., Panda, H. S., Pradhan, N., Sarika, C., Panda, P. K., Rao, B. V. S., Prasad, R. B. N. & Sukla, L. B. (2012). Microalgae of Odisha coast as a potential source for biodiesel production. *World Environment*, 2, p. 11-16.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I. (2011). Fatty acid profile and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, 11, 124.
- Mansour, M. P., Volkman, J. K., & Blackbourn, S. I. (2003). The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate *Gymnodinium* sp. In batch culture. *Phytochemistry*, 63, p. 145-153.
- Menezes, R. S., Leles, M. I. G., Soares, A. T., Franco, P. I. B., Antoniosi Filho, N. R., Sant'Anna, C. L., & Vieira, A. A. H. (2013). Avaliação da potencialidade de

- microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*, 36, p.10-15.
- Miao, X. & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97, p. 841-846.
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., & Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180-197.
- Mooney, B. D., Nichols, P. D. Salas, M. F. & Hallegraeff, G. M. (2007). Lipid, fatty acid, and sterol composition of eight species of Kareniaceae (Dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins. *J. Phycol.* 43, p. 101-111.
- Moreira, N. X., Curi, R., & Mancini Filho, J. (2002). Ácidos graxos: uma revisão. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr*, 24, p.105-123.
- Parrish C. (1987). Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroscan flame ionization detection. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 44, 722-731.
- Parrish, C. C. (1988). Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. *Marine Chemistry*, 23(1), 17-40.
- Parrish, C. C. (2013). Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography*, 2013.
- Parrish, C. C., Nichols, P. D., Pethybridge, H., & Young, J. W. (2014). Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia*, 177, p. 85-95.

- Petkov, G. & Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of green alga *Chlorella*? *Biochem. Systemat. Ecol.* 35, p. 281-285.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P., & Noiraksar, T. (2005). Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarinn J, Sci, Technol.* 27, p. 1179-1187.
- Pronina, N. A., Rogova, N. B., Furnadzhieva, S. & Klyachkogurvich, G. L. (1998). Effect of CO₂ concentration on the fatty acid composition of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii* CIA-3 a mutant deficient in CO₂-concentrating mechanism. *Russ. J. Plant Physiol.* 45, 447-455.
- Renaud, S. M.; Thinh, L. V. & Parry, D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170, p. 147-159.
- Selvarajan, R., Felföldi, T., Tauber, T., Sanniyasi, E., Sibanda, T., & Tekere, M. (2015). Screening and evaluation of some green algal strains (Chlorophyceae) isolated from freshwater and soda lakes for biofuel production. *Energies*, 8, p.7502-7521.
- Shifrin, N. S. & Chisholm, S. W. (1981). Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17, 374-384.
- Kumari, P., Bijo, A. J., Mantri, V. A., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2012). Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry*, 86, 44-56.
- Soares, A. T. (2012). Estudo da extração, da composição química e do teor de lipídeos graxos em microalgas visando sua utilização como matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. Dissertação de mestrado. Instituto de química. Universidade Federal de Goiás, p. 198.

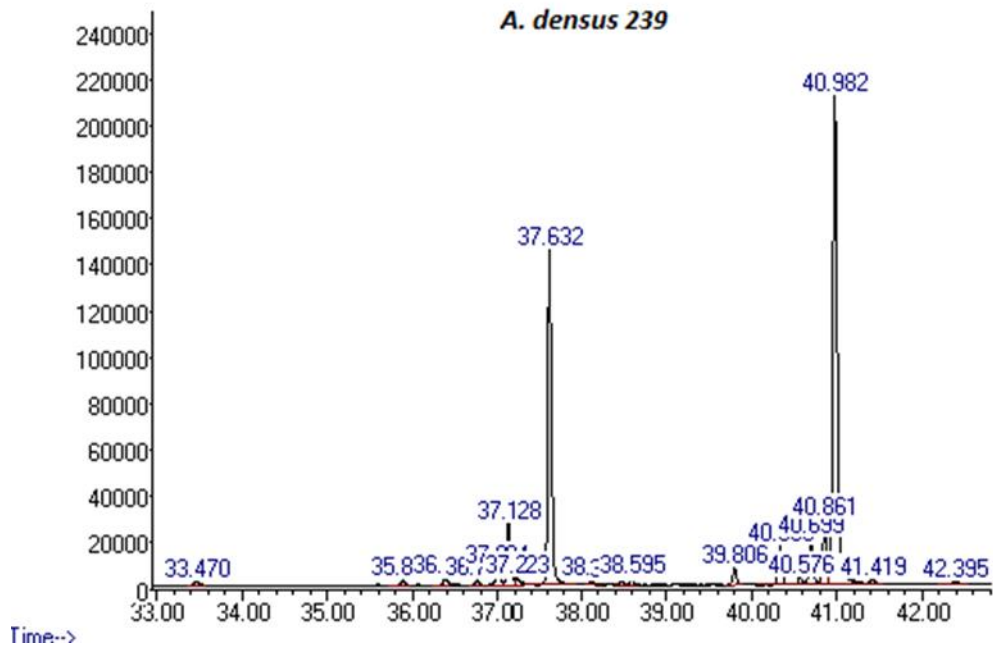
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Zhang, S., Ma, G., Han, L., & Ji, Y. (2014). Identification and characterization of a freshwater microalga *Scenedesmus* SDEC-8 for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource technology*, 162, p. 129-135.
- Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Gallowat, A. W. E., Ojala, A. & Brett, M. (2013). Fatty acid composition as biomarker of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquat. Microb. Ecol.* 71, p. 165-178.
- Thompson, P. A & Harrison, P. J. (1992). Effects of monospecific diets of varying biochemical composition on the growth and survival of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Mar. Biol.* 113, p. 645-654.
- Vargas, M. A., Rodriguez, H., Moreno, J., H. Olivares, J. A., Del Campo, J. A., Rivas, J. & Guerrero, M. G. (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing Cyanobacteria. *J. Phycol.* 34, p. 812-817.
- Volkman, J. K., Barret, S. M., Blackburn, S. I., Monsour, M. P., Sikes, E. L. & Gelin, F. (1998). Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Organic Geochemistry*, 929, p. 1163-1179.
- Volkman, J. K., Farmer, C. L., Barret, S. M. & Sikes, E. L. (1997). Unusual dihydroxysterols. As chemotaxonomic markers for microalgae from the order *Pavlova*les (Haptophyceae). *J. Phycol.* 33, p. 1016-1023.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I., & Garland, C. D. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), 219-240.
- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology advances*, 21, p. 273-294.

- Zhao, Y., Li, D., Ding, K., Che, R., Xu, J. W., Zhao, P., Li, T., Ma, H., & Yu, X. (2016). Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 through heterotrophic cultivation and photo-chemical modulator induction. *Bioresource Technology*, 211, p. 669-676.
- Yee, W. (2016). Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 1-11.
- Yu, X., Zhao, P., He, C., Li, J., Tang, X., Zhou, J., Huang, Z. (2012). Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology* 121: 256–2
- Zhu, C.J., Lee, Y.K. & Chao, T. M. (1997). Effect of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.* 9, p. 451-457.
- Zhukova, N. V. & Aizdaicher, N. A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39, p. 351-356.

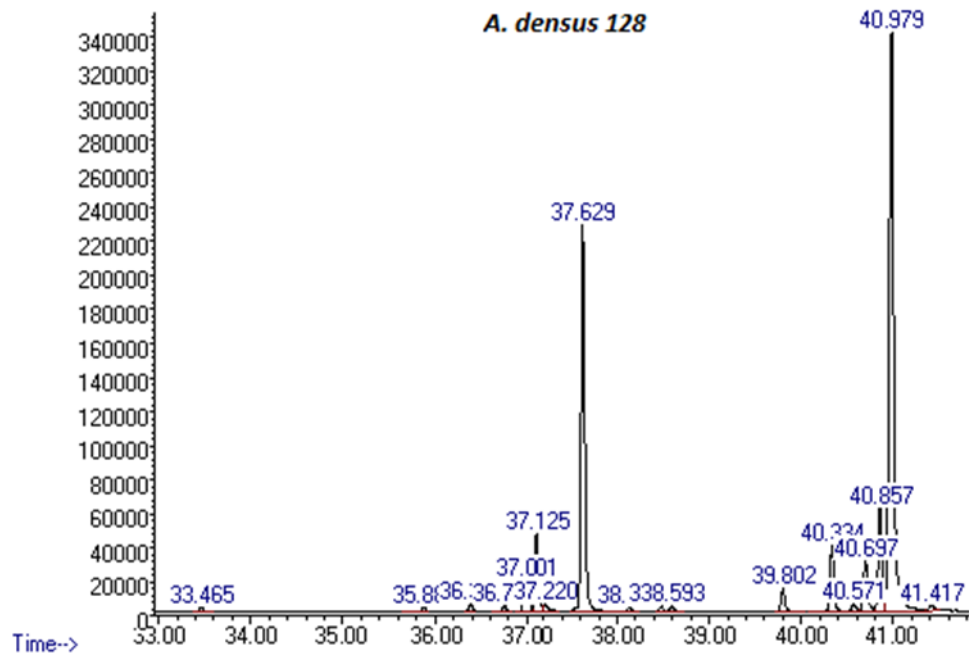
CONCLUSÃO GERAL

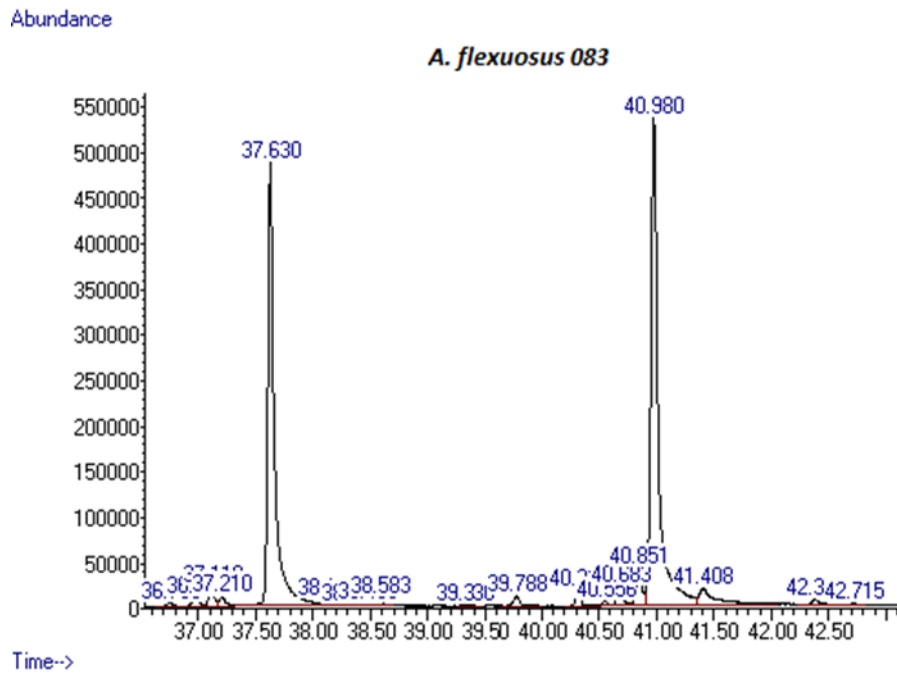
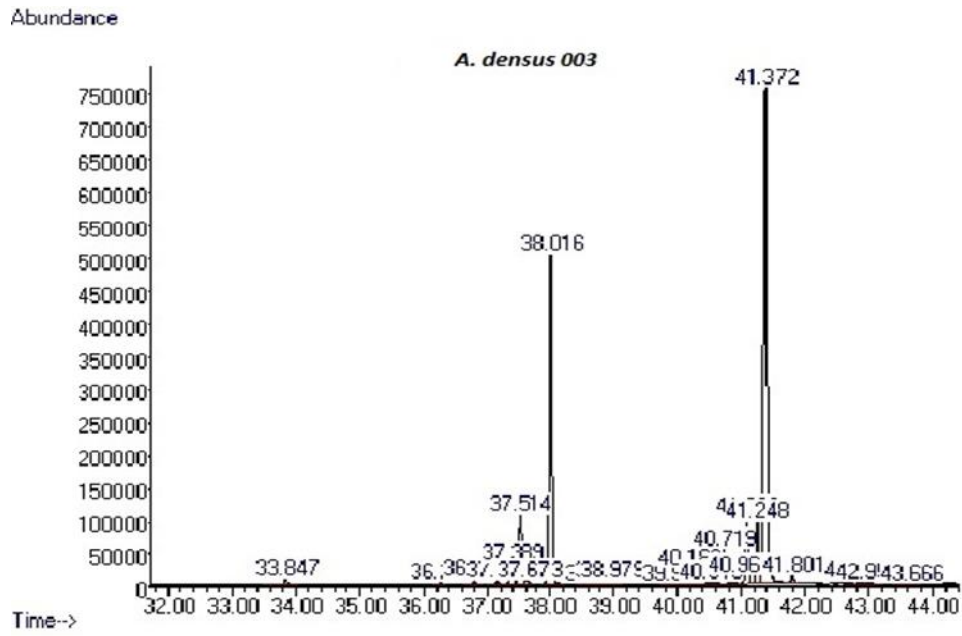
- 1- Os perfis de ácidos graxos mostraram potencial como ferramenta quimiotaxonômica através técnica de GC/MS, diferenciando as cepas das microalgas e indicaram que os ácidos graxos podem ser utilizados como indicadores de gêneros e família taxonômica.
- 2- A presença de ácidos graxos específicos em algumas cepas corroborou a hipótese de possível erro na identificação de algumas cepas de Selenastraceae analisadas.
- 3- Apresentamos o perfil lipídico geral das cepas de espécies da família Selenastraceae, e com exclusividade, o perfil lipídico do novo gênero *Curvastrum*.
- 4- Foram encontrados os ácidos graxos de interesse comercial, para a produção de biocombustível, alimentação de animais e ácidos graxos essenciais para suplementação nutricional humana.
- 5- Observamos a possibilidade de manipulação do perfil lipídico de espécies a partir de mudanças na forma de cultivo e fases de crescimento em que pode ser feita a colheita da biomassa, o que pode ser útil de acordo com o interesse de aplicação.
- 6- Agregamos conhecimento sobre ácidos graxos presentes nas espécies da família Selenastraceae, abrindo espaço para novos estudos relacionados a esse assunto.

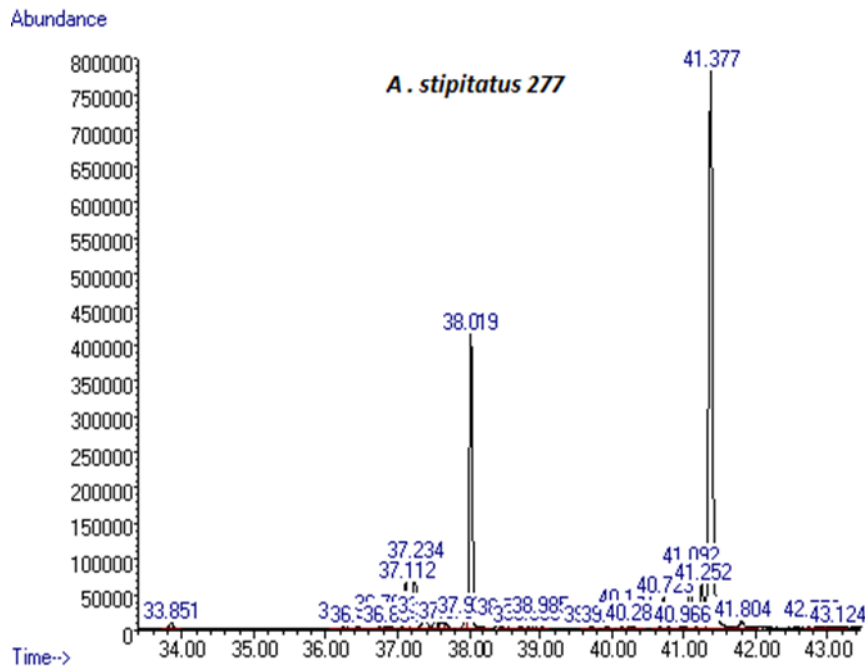
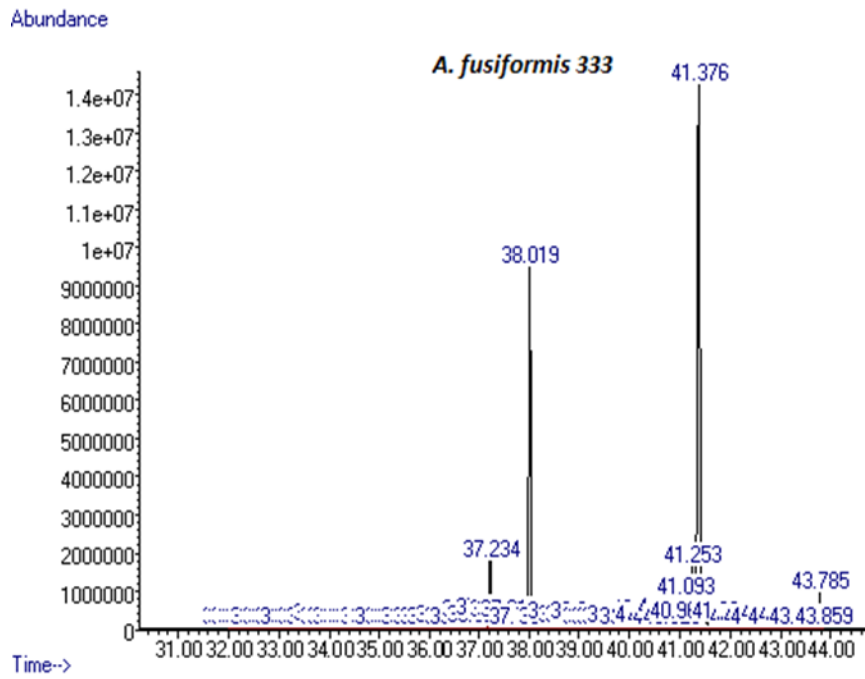
Abundance

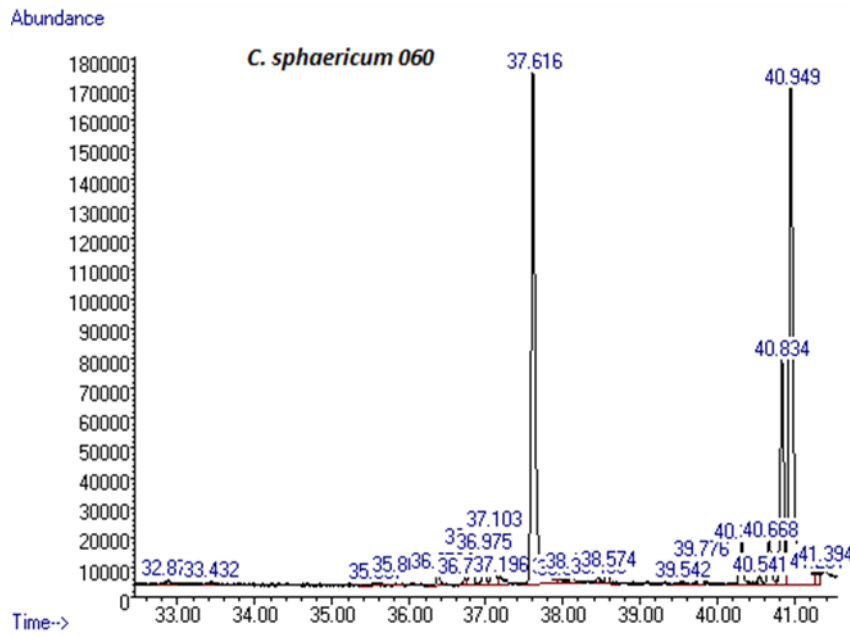
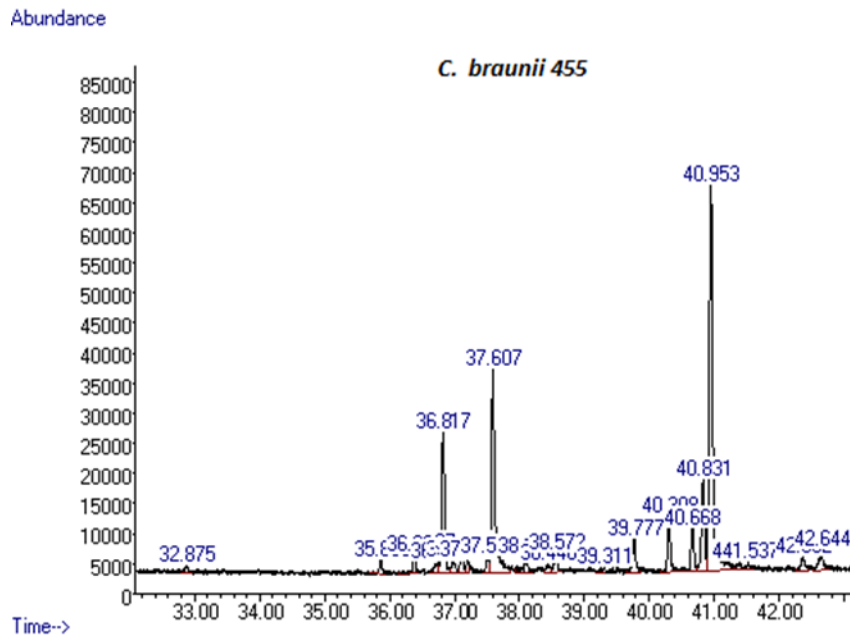


Abundance



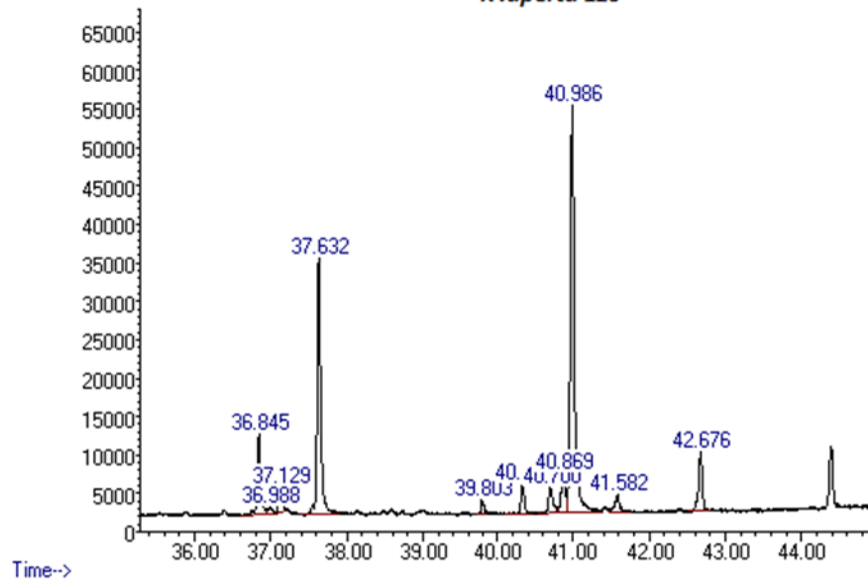






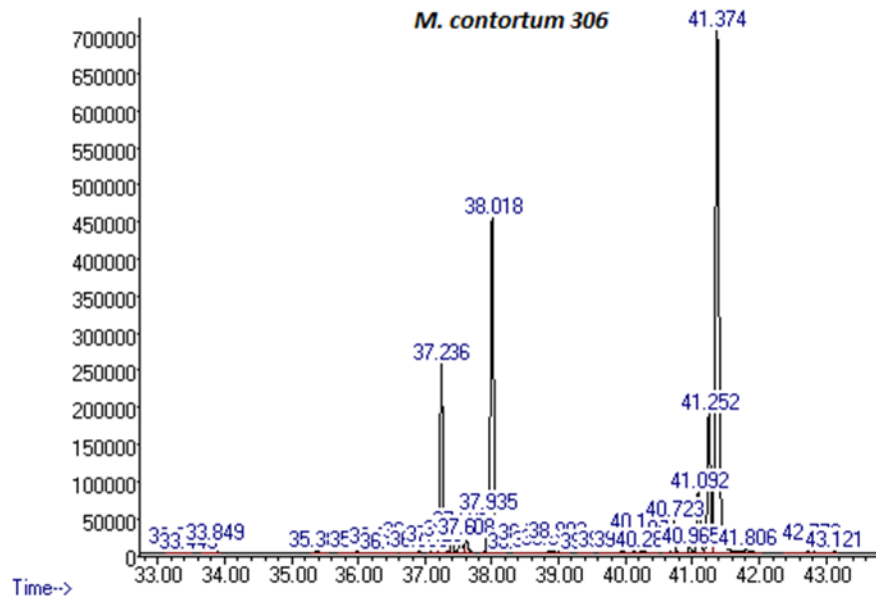
Abundance

K. aperta 123

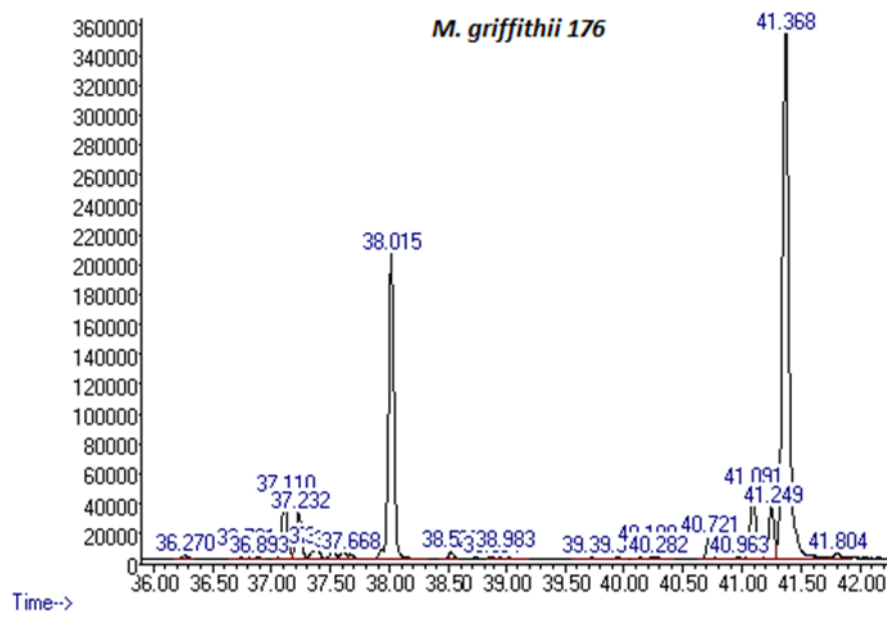


Abundance

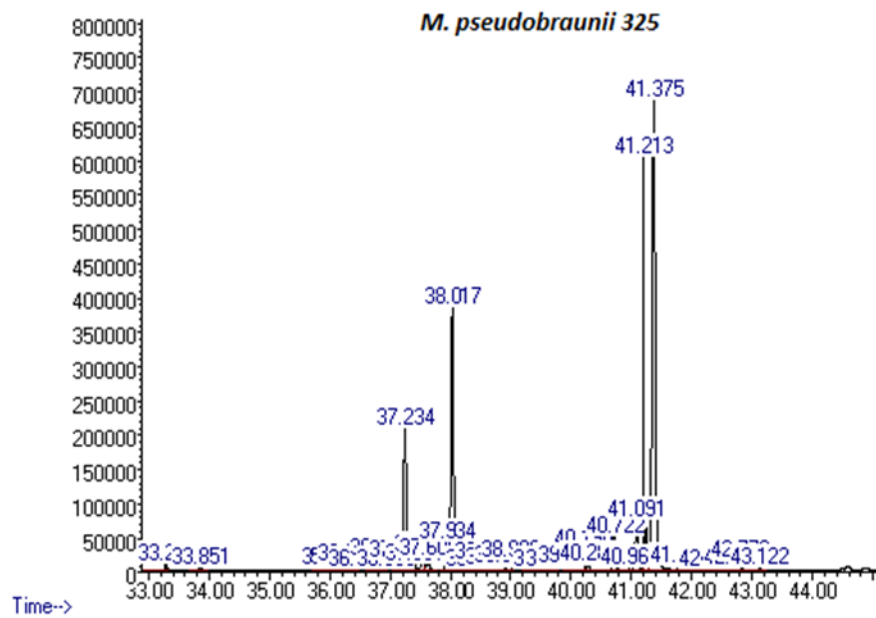
M. contortum 306



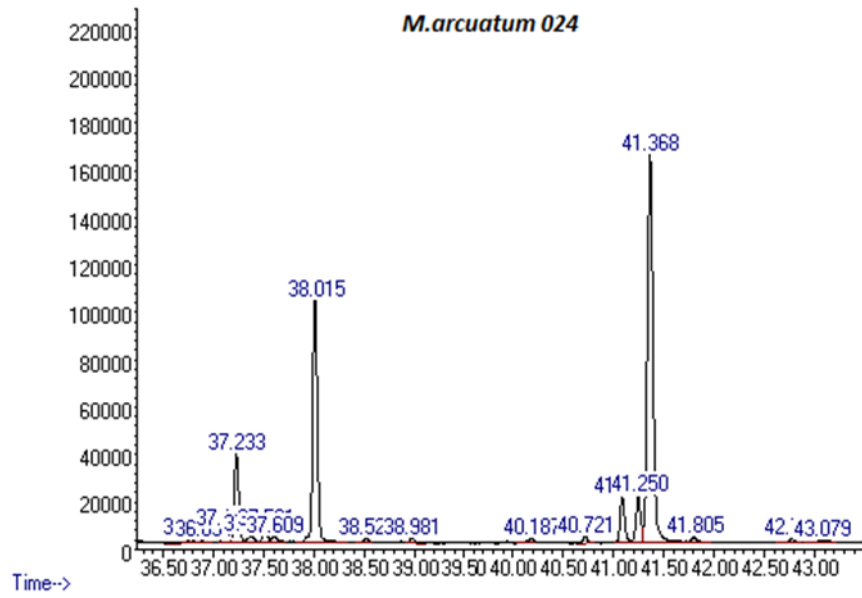
Abundance



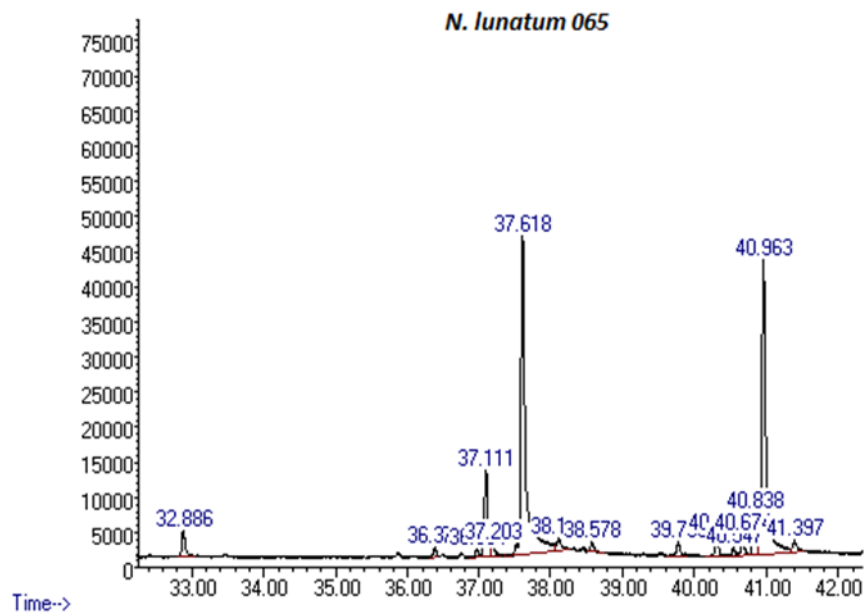
Abundance



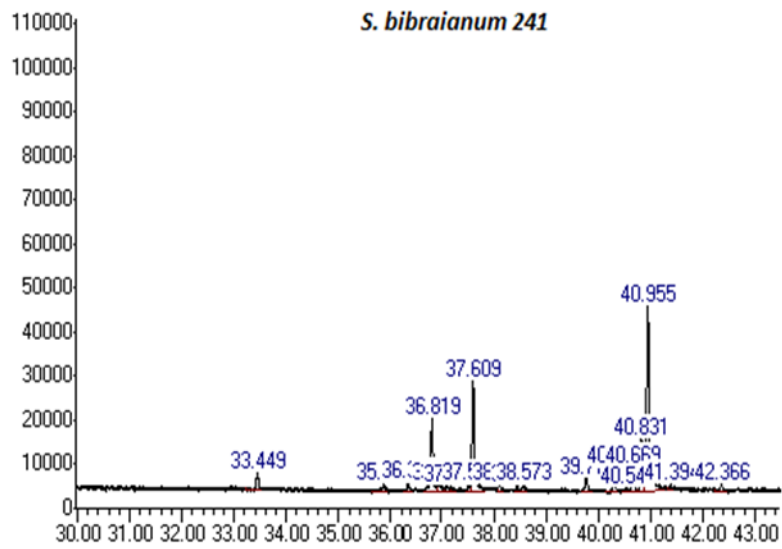
Abundance



Abundance

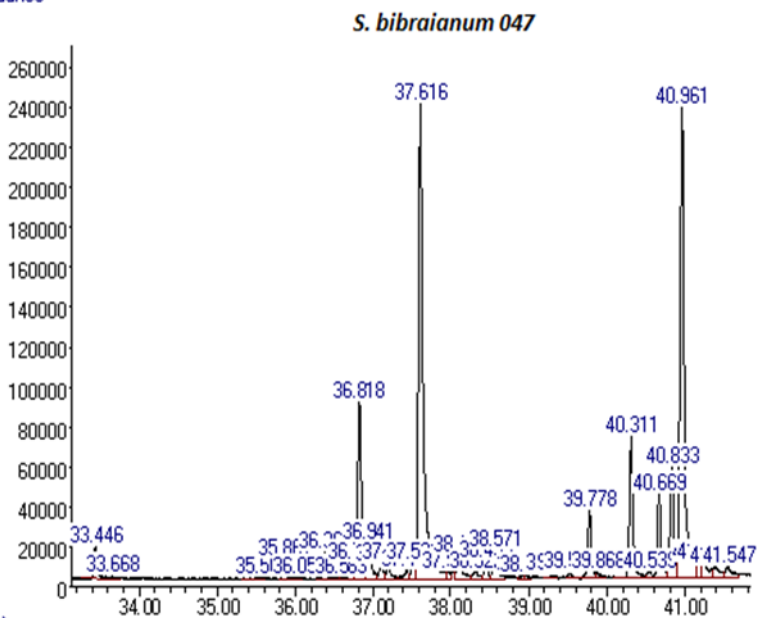


Abundance

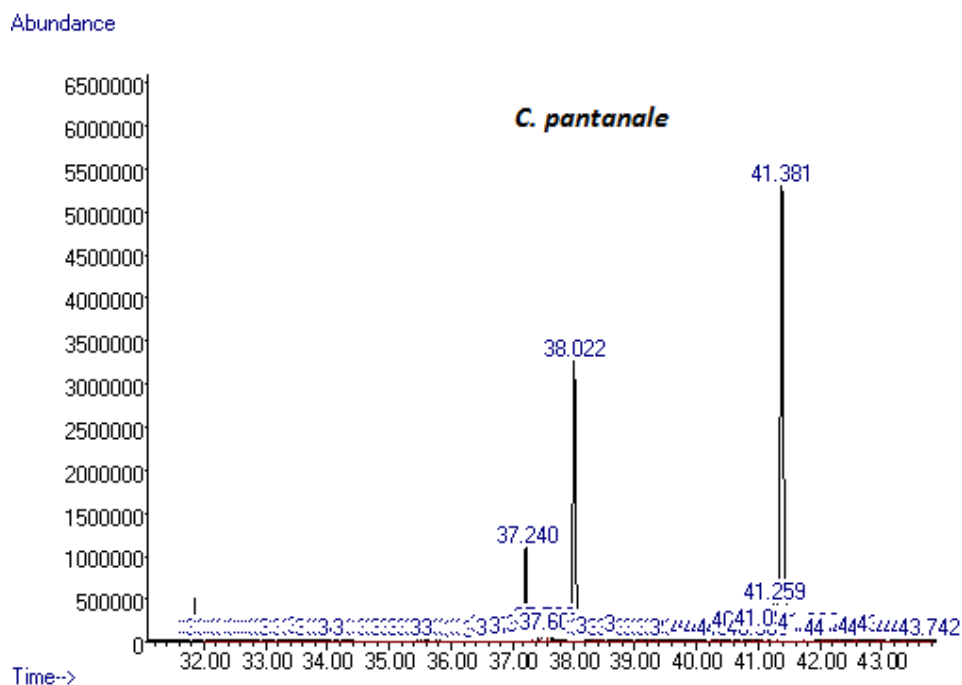


Time-->

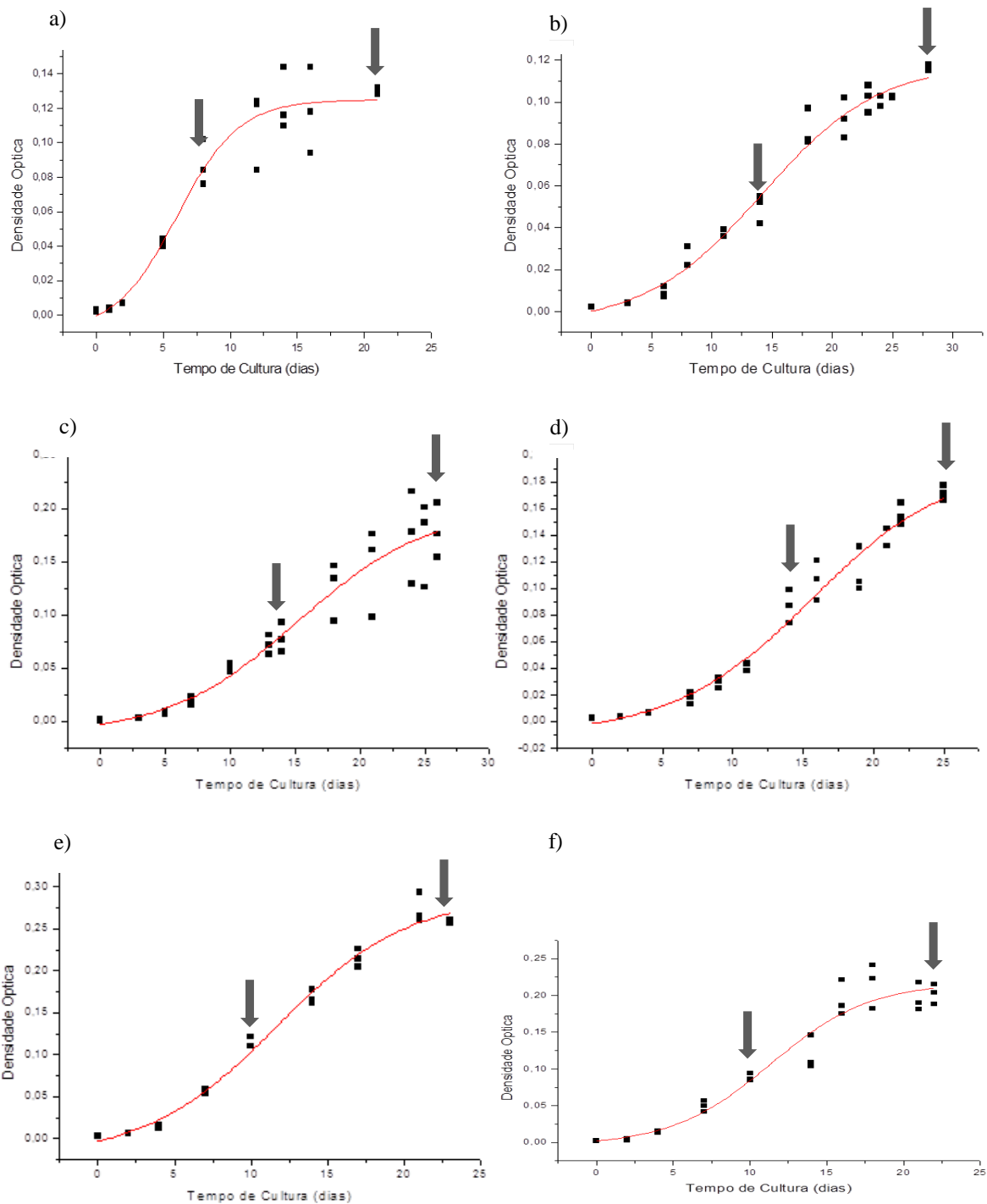
Abundance



Time-->



Anexo 1. Cromatogramas obtidos por GC/MS dos FAMES, após o processo de Transesterificação Direta (T.D), de *A. densus* (CCMA-UFSCar 3), *A. densus* (CCMA-UFSCar 128), *A. densus* (CCMA-UFSCar 239), *A. flexuosus* (CCMA-UFSCar 83), *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 333), *A. stipitatus* (CCMA-UFSCar 277), *C. braunii* (CCMA-UFSCar 455), *K. aperta* (CCMA-UFSCar 123), *M. arcuatum* (CCMA-UFSCar 24), *M. contortum* (CCMA-UFSCar 306), *M. griffithii* (CCMA-UFSCar 176), *M. komarkovae* (CCMA-UFSCar 353), *M. pseudobraunii* (CCMA-UFSCar 325), *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 47), *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 241) e *C. pantanale* (CCMA-UFSCar 350).



Anexo 2. Curvas de crescimento de seis cepas de Selenastraceae que tiveram seus ácidos graxos analisados em duas fases de crescimento distintas: a metade da fase exponencial (EXP) e início da fase estacionária (EST) de crescimento celular. a) *S. bibrainum* (CCMA-UFSCAR 47); b) *K. aperta* (CCMA-UFSCAR 123); c) *A. densus* (CCMA-UFSCAR 128); d) *A. densus* (CCMA-UFSCAR 239); e) *A. fusiformis* (CCMA-UFSCAR 333); f) *C. braunii* (CCMA-UFSCAR 455).