

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO  
CULTIVO DA MICROALGA *Messastrum gracile*  
(Reinsch) T. S. Garcia**

**Mayara Cristina Malvas Nicolau**

Jaboticabal, São Paulo  
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO  
CULTIVO DA MICROALGA *Messastrum gracile*  
(Reinsch) T. S. Garcia**

**Mayara Cristina Malvas Nicolau**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Lupino Gratão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo  
2020

N639a Nicolau, Mayara Cristina Malvas  
Avaliação de antioxidantes no cultivo da microalga *Messastrum gracile* (Reinsch)  
T. S. Garcia / Mayara Cristina Malvas Nicolau. -- Jaboticabal, 2020  
x, 72 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura,  
2020  
Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba Tavares  
Coorientadora: Priscila Lupino Gratão  
Banca examinadora: Antônio Fernando Monteiro Camargo, Rodrigo Ney Millan  
Bibliografia

1. Antioxidantes. 2. *Messastrum gracile*. 3. Luminosidade. I. Título. II.  
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

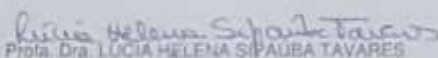
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de antioxidantes no cultivo da microalga *Messastrium gracilis* (Reinsch) T. S. Garcia

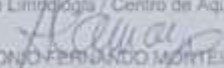
AUTORA: MAYARA CRISTINA MALVAS NICOLAU

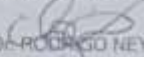
ORIENTADORA: LÚCIA HELENA SIPAUBA TAVARES

COORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, área: Biologia Aquática pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LÚCIA HELENA SIPAUBA TAVARES  
Laboratório de Limnologia / Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP

  
Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO MONTEIRO CAMARGO  
Departamento de Ecologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

  
Prof. Dr. RODRIGO NEY MILLAN  
Departamento de Ciências Exatas / Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG, Fozai-MG

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2020

**DEDICO:**

A minha família que sempre me apoiou para que eu seguisse e realizasse meus sonhos e por ser o espelho de quem eu quero me tornar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar durante minha trajetória, por me abençoar nos momentos de fraqueza.

A minha orientadora Profa. Dra. Lúcia H. Sipaúba Tavares pelo crescimento pessoal e profissional, por me apresentar a microalga e a ecologia, pelos ensinamentos durante meu projeto, principalmente na escrita, e pela oportunidade do mestrado e orientação.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Lupino Gratão por me incentivar a voar e conhecer coisas novas, pela preocupação, por não me deixar desistir, por acreditar sempre em mim, pelos ensinamentos e crescimento que eu tive e pela amizade.

A toda minha família, meus tios, meu avô, meus pais, minha irmã e meus primos, por acompanharem todos os meus passos e sempre me ajudarem no que fosse preciso. Obrigada por acreditarem em mim, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

A todos os meus colegas do laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, Juliane, Bruno, Mayara, Débora e Japa que me ajudaram sempre que precisei, pelos ensinamentos no laboratório e amizade que ganhei, principalmente a Mayara por toda ajuda e disponibilidade para fazer o projeto acontecer.

Também a todos os meus colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal por me auxiliarem nas análises, principalmente a Cássia que me ensinou todas as análises, que não mediu esforços para me ajudar, mesmo distante sempre retirava um tempo do seu dia para me auxiliar ou para me mostrar que as coisas dariam certo.

Em especial agradeço a técnica Soninha pelo auxílio durante cada protocolo, pela palavra amiga, pelo conforto do abraço, por sempre torcer por mim e pelos cuidados dentro e fora do laboratório. Ao técnico Rodrigo pela disponibilidade e ajuda com os equipamentos.

Agradeço a Mirela e ao Gilmar por toda a ajuda e ensinamento no laboratório durante meu projeto, mas acima disso agradeço pela amizade, por me entenderem em todos os momentos e me mostrarem quando eu não estava certa e continuarem ao meu lado apesar disso. Pelas palavras sempre precisas e tão calmas e acolhedoras nos momentos de desespero e tristeza. Por acreditarem em mim sempre e me mostrarem que as coisas acontecem no momento certo e

principalmente por me mostrarem quão sortuda eu sou por tê-los ao meu lado e por sempre ter com quem contar.

As minhas amigas (Gabi, Isabella, Ana e Leticia) e amigos de Jaboticabal e de Pontal, por torcerem por mim, me ajudarem em todos os momentos e entenderem minhas ausências em outros momentos.

A Capes pelo financiamento da bolsa.

Ao Caunesp, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e o laboratório de fisiologia vegetal (FCAV) pelas análises de antioxidante.

E a todos que contribuíram com este trabalho e minha formação, meus sinceros agradecimentos.

## **APOIO FINANCEIRO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES (1768969) pela bolsa concedida. A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro (14/24697-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Sumário

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                       | ix |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                       | xi |
| RESUMO .....                                                                                                                 | 7  |
| ABSTRACT .....                                                                                                               | 8  |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                                     | 9  |
| 2 OBJETIVO GERAL.....                                                                                                        | 11 |
| 2.1 Objetivos específicos .....                                                                                              | 11 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                | 12 |
| 3.1 <i>Messastrum gracile</i> (Reinsch) T. S. Garcia .....                                                                   | 12 |
| 3.2 Microalgas como agente antioxidante.....                                                                                 | 14 |
| 3.3 Importância e cultivo da microalga.....                                                                                  | 17 |
| 3.4 Influência da luminosidade em microalgas .....                                                                           | 20 |
| 4 DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO E ANÁLISE DE ANTIOXIDANTE.....                                                         | 22 |
| 5 REFERÊNCIA .....                                                                                                           | 28 |
| CAPÍTULO 1 - Interferência da luminosidade na atividade dos antioxidantes em <i>Messastrum gracile</i> (Chlorophyceae):..... | 37 |
| RESUMO .....                                                                                                                 | 38 |
| ABSTRACT .....                                                                                                               | 39 |
| 1. Introdução .....                                                                                                          | 40 |
| 2. Material e métodos.....                                                                                                   | 41 |
| 2.1. Microalga e condições de cultivo .....                                                                                  | 41 |
| 2.2. Crescimento e Parâmetros do meio de cultura.....                                                                        | 42 |
| 2.3. Análise do estresse oxidativo: Peroxidação lipídica.....                                                                | 42 |
| 2.4. Extração de enzimas e determinação de proteínas .....                                                                   | 43 |
| 2.5. Análise da atividade de antioxidantes.....                                                                              | 43 |
| 2.6. Análise estatística .....                                                                                               | 44 |
| 3. Resultados .....                                                                                                          | 44 |
| 3.1. Crescimento da microalga e variáveis do meio de cultura .....                                                           | 44 |
| 3.2. Avaliação do estresse e antioxidantes da microalga .....                                                                | 47 |
| 4. Discussão e conclusões.....                                                                                               | 51 |
| 5. Referências .....                                                                                                         | 54 |

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ANEXO - Uso da biomassa da microalga <i>Messastrum gracile</i> via pré-tratamento de sementes no crescimento da <i>Lactuca sativa</i> ..... | 57 |
| RESUMO .....                                                                                                                                | 58 |
| ABSTRACT .....                                                                                                                              | 59 |
| 1. Introdução.....                                                                                                                          | 60 |
| 2. Material e métodos .....                                                                                                                 | 61 |
| 2.1 Cultivo e Biologia da <i>Messastrum gracile</i> .....                                                                                   | 61 |
| 2.2 Dados biológicos da <i>Messastrum gracile</i> .....                                                                                     | 62 |
| 2.3 Antioxidantes da <i>Messastrum gracile</i> .....                                                                                        | 62 |
| 2.4 Tratamento na Alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) .....                                                                                    | 63 |
| 2.5 Germinação e crescimento de plântulas.....                                                                                              | 63 |
| 2.6 Peroxidação lipídica das plântulas de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) .....                                                            | 63 |
| 2.7 Análise estatística .....                                                                                                               | 64 |
| 3. Resultados .....                                                                                                                         | 64 |
| 3.1 <i>Messastrum gracile</i> .....                                                                                                         | 64 |
| 3.1.1 Biologia e o meio de cultura .....                                                                                                    | 64 |
| 3.2 <i>Lactuca sativa</i> .....                                                                                                             | 66 |
| 4. Discussão e conclusão .....                                                                                                              | 69 |
| 5 Referências .....                                                                                                                         | 71 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura1: Eletrón-micrografia de varredura de exemplares da microalga <i>Messastrum gracile</i> em aumento (330x).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 11 |
| Figura 2: Demonstração dos cultivos da microalga <i>Messastrum gracile</i> em laboratório em volume de 2L e 10L (A). Repicagem da microalga para cultivo e avaliação da biomassa (B).....                                                                                                                                                                                                                                                      | 21 |
| Figura 3. Diagrama esquemático do cultivo da microalga <i>Messastrum gracile</i> em diferentes fases de crescimento para a produção da biomassa algal. A- Inóculo da microalga (cepa). B- Aumento da biomassa transferindo para erlenmeyer de 250 ml. C- Avaliação do crescimento da microalga no volume de 2 L. D- Cultivo em volume de 13 L para centrifugação. E- Biomassa algal centrifugada para posterior avaliação de antioxidante..... | 22 |
| Figura 4: Imagens do cultivo da microalga <i>Messastrum gracile</i> em condições de estresse em função da elevação da luminosidade ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                          | 23 |
| Figura 5: Diferentes fases da curva de crescimento de microalgas em sistemas de cultivo tipo <i>Batch</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 24 |
| A- Demonstração da densidade algal ao longo da curva de crescimento.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 24 |
| B- Desenho esquemático do padrão da curva de crescimento microalga ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 24 |
| Figura 6: Processo de centrifugação da <i>M. gracile</i> (A) e o resultado do processo, em que a microalga está na forma de pasta (B).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 25 |
| Figura 7: Microalga sendo centrifugada (A) e sonicada para posterior extração dos antioxidantes (B) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 26 |

## Capítulo 1

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1: Densidade celular do crescimento de <i>Messastrum gracile</i> em cultivo sem estresse e exposta ao estresse luminoso de 24 e 72 horas nos diferentes dias de cultivo (7, 14, 21 e 28) .....       | 42 |
| Fig. 2: Proteína total durante o crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> em cultivo sem estresse e expostas a estresse luminoso de 24 e 72 horas.....                              | 44 |
| Fig 3: Nível de estresse (MDA) em <i>Messastrum gracile</i> durante o período de crescimento (7, 14, 21, 28 dias) em cultivo sem estresse e exposta ao estresse luminoso de 24 e 72 horas .....           | 45 |
| Fig. 4: Concentração de pigmentos (clorofila a, carotenoides e clorofila total) em <i>Messastrum gracile</i> nas três condições de cultivo: sem estresse, estresse luminoso de 24 e 72 horas .....        | 46 |
| Fig. 5: Atividade específica dos antioxidantes durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28) de <i>Messastrum gracile</i> em cultivo sem estresse e exposta ao estresse luminoso de 24 e 72 horas ..... | 47 |

## Anexo

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1: Germinação das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse .....                               | 61 |
| Fig. 2: Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse ..... | 62 |
| Fig. 3. Altura da plântula e comprimento da raiz de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse luminoso.....      | 63 |
| Fig. 4. Massa seca da plântula de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse luminoso.....                        | 63 |
| Fig. 5: Conteúdo de MDA das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e em sem estresse .....                       | 64 |

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Tabela 1: Média e desvio padrão das variáveis do meio de cultura e condições biológicas de *Messastrum gracile* nas três condições de cultivo: sem estresse, estresse luminoso de 24 e 72 horas) avaliadas em diferentes etapas da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias).....43

### Anexo

Tabela 1: Variáveis do meio de cultura e condições biológicas de *Messastrum gracile* nas duas condições de cultivo: sem estresse e estresse luminoso de 24 horas avaliadas em diferentes etapas da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias). .....60

Tabela 2. Antioxidantes enzimáticos (GSH-Px, CAT, SOD, GPOX, GR em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) e não enzimático (Carotenoides em  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) produzidos pela microalga *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e sem estresse durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias)..... 61



## RESUMO

As microalgas apresentam diversos compostos metabólitos que, atualmente, vem sendo extraídos de forma ascendente para originar produtos naturais. Um desses produtos são os antioxidantes cuja função é de proteger as células contra os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ERO). A microalga *Messastrum gracile* (Reinsch) T. S. Garcia é um importante recurso devido a seu fácil cultivo, grande quantidade de nutrientes, possível efeito antioxidante e principalmente pelo baixo custo. Nas microalgas, a luminosidade é um importante fator para seu desenvolvimento e produção de compostos nutricionais e metabólicos e, quando ofertada em excesso, pode gerar um estresse e afetar a produção de antioxidantes do organismo. Assim o projeto avaliou o potencial efeito dos antioxidantes produzidos pela microalga *Messastrum gracile* em cultivo ideal de luminosidade ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e cultivo com estresse luminoso de  $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  por dois períodos (24 horas e 72 horas). A microalga foi cultivada em meio de cultura CHU<sub>12</sub>, em galões de 10 L, e foi avaliada em quatro períodos da curva de crescimento: 7º, 14º, 21º e 28º dia. Os antioxidantes Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e os carotenoides foram mais efetivos no 7º dia de crescimento da microalga, durante o cultivo ideal de luminosidade obtendo uma melhor resposta frente a peroxidação lipídica, em comparação com os cultivos de estresse luminoso de 24 e 72 horas. Os resultados obtidos permitem concluir que é possível cultivar a microalga até o 7º dia de crescimento sem aumentar o fornecimento de luz para produzir uma quantidade maior de antioxidantes, sem prejuízo para *M. gracile*.

Palavras-chave: Antioxidantes, *Messastrum gracile*, luminosidade.

## ABSTRACT

Microalgae presents several metabolic compounds which have been extracted in order to obtain natural products. The antioxidants, which protects the cells from free radicals and reactive oxygen species (ROS) are among those compounds. The microalgi *Messastrum gracile* (Reinsch) T.S. Garcia is an important resource due to easiness on cultivation, great nutrients amount, potential antioxidant effect and mainly for its low-cost production. Light is an important factor for the development and nutritional compound production of microalgae. When in excess may result in a stress which affects the antioxidants production. The aim of the present research was to evaluate the antioxidants activity produced by the microalgi *Messastrum gracile* grown in optimal light conditions ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) compared with cultivation submitted to two light stress periods ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 24 and 72 hours prior to sampling). The microalgi was grown on CHU<sub>12</sub> culture medium, in 10 L containers and was assessed in four periods: 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day. The antioxidants Catalase, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Carotenoids were more effective at seven days of growth and at optimal light conditions and the lipid peroxidation presented better results in comparison with light stress conditions. The obtained results allow to conclude that is possible to grow *Messastrum gracile* until the 7<sup>th</sup> growth day without increasing light intensity to produce a higher antioxidant amount, with no harm to the microalgi.

Keywords: Antioxidant, *Messastrum gracile*, luminosity.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas são organismos que apresentam diversificada composição bioquímica e têm atraído interesse na área comercial e de produção para a obtenção de compostos de alto valor nutricional (GARCÍA-ROMERAL et al., 2017).

No ambiente aquático as microalgas desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes, balanço do pH e na remoção de dióxido de carbono, gerando oxigênio e promovendo melhoria na qualidade da água, através da absorção de compostos nitrogenados (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Também atuam na remoção de nutrientes, elementos químicos, metais pesados e micro-organismos patogênicos presentes em águas residuais, sendo uma tecnologia limpa e sustentável para o tratamento de efluentes (ANSILAGO et al., 2016). Além disso, são fonte de micronutrientes, vitaminas e lipídeos para toda a comunidade aquática sendo de grande importância na produção e balanço de oxigênio dissolvido na água e servindo como fonte de alimento para diversas espécies, sendo um elo na cadeia alimentar (BARCELLOS et al., 2012).

O interesse em cultivar microalgas chama atenção em relação ao valor comercial de produtos extraídos e ampla variedade de aplicações (GULDHE et al., 2017). As microalgas assimilam os nutrientes incorporando-os à sua biomassa, obtendo um produto nutricionalmente rico, podendo ser utilizado como suplemento em diversas áreas. A produção de nutrientes e metabolitos varia ao longo das fases de crescimento da microalga, produzindo os nutrientes necessários para seu metabolismo (MORIOKA et al., 2014).

Compostos com atividade antioxidante podem ser encontrados em algumas microalgas, como as Chlorophyceae, devido a sua variedade de nutrientes, vitaminas, enzimas e carotenoides. Por se tratarem de organismos fotossintetizantes, a luz é um fator importante para o seu desenvolvimento e composição bioquímica. A alta luminosidade pode afetar o metabolismo, gerando uma desordem e um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), elevando consequentemente as respostas da linha de defesa, os antioxidantes.

Os carotenoides, importantes antioxidantes não enzimáticos, são utilizados na aquicultura para ressaltar a coloração de camarões, peixe salmonídeos e peixes ornamentais (BROWN, 2002). Também são utilizados na indústria cosmética e farmacêutica e na alimentação humana (MARIANO, 2014; EL GAMAL, 2010).

Alguns estudos relatam que os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos provenientes de microalgas podem prevenir e impedir diversas doenças, como a diabetes, doenças cardíacas e o câncer, podendo ser utilizadas para a fabricação de medicamentos (SHANAB et al, 2012; LUO et al., 2015).

Há um grande interesse em encontrar novos e seguros antioxidantes a partir de fontes naturais para prever a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos das células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos tem decrescido devido a sua atividade suspeita como promotor da carcinogênese (SHANAB et al., 2012).

Assim, a microalga *Messastrum gracile*, poderá ser uma linha de partida para utilização como produto de antioxidante natural para o uso no mercado e na pesquisa.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a atividade dos antioxidantes da microalga *Messastrum gracile* em cultivo sem estresse luminoso ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e cultivo com estresse luminoso de  $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  por dois períodos (24 horas e 72 horas).

### 2.1 Objetivos específicos

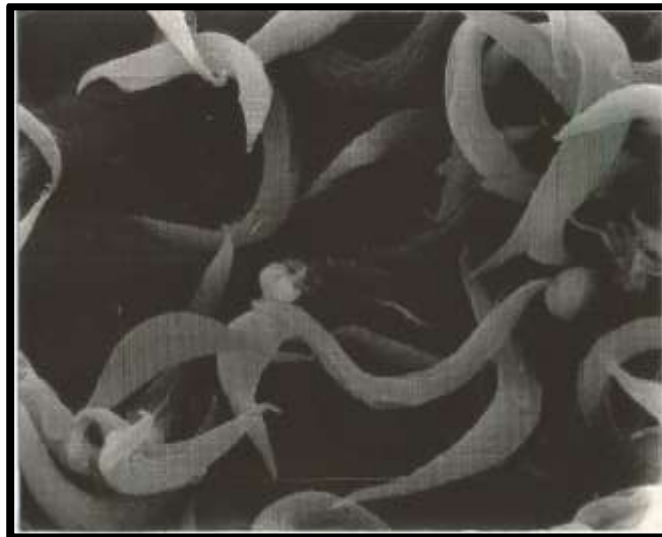
- Avaliar qual método deve ser adotado para a extração do antioxidante;
- Determinar o período de maior produção dos antioxidantes durante a curva de crescimento da microalga;
- Verificar qual antioxidante é produzido em maior escala
- Verificar se o estresse com maior intensidade de luz afeta a produção de antioxidantes;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Messastrum gracile* (Reinsch) T. S. Garcia

*Messastrum gracile* anteriormente era nomeada como *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov, mas Garcia da Silva et al. (2017) realizaram análises moleculares com o gene 18S rDNA concluindo que o gênero deveria ser modificado, sendo então classificada como *Messastrum gracile* T. S. (Garcia) (Figura 1).

Figura 1: Eletrón-micrografia de varredura de exemplares da microalga *Messastrum gracile* em aumento (330x).



Fonte: BACHION, 1996

De acordo com GUIRY & GUIRY (2019), a posição sistemática atual desta microalga é a seguinte:

**Classe:** Chlorophyceae

**Ordem:** Sphaeropleales

**Família:** Selenastraceae

A Chlorophyta é referente ao grupo de algas verdes e se caracteriza por conter cloroplastos com dupla membrana, tilacoides empilhados, amido como reserva e clorofila *a* e *b* (FRIEDL, 1997; CHAPMAN et al., 1998). Esta divisão engloba organismos de água marinha e doce, sendo consideradas as principais produtoras primárias dos ambientes aquáticos (BOCK, 2010).

As algas Chlorophyceae constituem um grupo muito amplo e variado de microalgas que podem ser: unicelulares, de vida colonial, filamentosa. São altamente exploradas em cultivo já que engloba táxons de fácil acesso em ambientes aquáticos (ESTEVES, 2011). Apresentam cor verde intensa devido a clorofila *a* e *b* que mascaram os carotenos e xantofilas. As Chlorophyceae comumente contêm em sua composição cerca de 32% de fibras totais, 10% de minerais, 44% de proteína, 12% de ácidos graxos e 2% de clorofila em relação ao peso seco (PANIANGUA, 2003). As Chlorophyceae unicelulares são geralmente selecionadas para cultivo em massa e utilizadas na alimentação de organismos aquáticos por apresentarem parede celular mais fina e, portanto, uma quantidade de carbono inorgânico total em relação ao peso seco mais elevado do que as diatomáceas.

A família Selenastraceae é cosmopolita, apresenta algas verdes, podendo ser solitárias ou coloniais e sem flagelos. O critério para a definição da família é a citocinese para a liberação de autósporos (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

A espécie *Messastrum gracile* tem coloração verde, com cloroplasto contendo pirenóide não apresentando amido. As células são semilunadas, estreitas e pontiagudas e sua reprodução é assexuada (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

Em um sistema de cultivo “indoor” esta microalga apresenta elevado valor nutricional, com um nível de proteína acima de 45% (SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Já sob diferentes formas de cultivo, foi encontrado um teor lipídico de 24% a 31% da massa seca para esta microalga estudada (MATA et al., 2010). Além disso quando cultivada em meios alternativos, como por exemplo em meios de cultura feitos à base de macrófitas, proporciona uma maior produção específica de determinados nutrientes, tal como aumento dos lipídeos ou das proteínas, sendo possível escolher o alvo do estudo, barateando o custo da sua produção e mantendo a qualidade dos nutrientes (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018 a-b; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2019). Fioresi & Sipaúba-Tavares (2008), também cultivaram esta espécie a base de esterco suíno, se mostrando uma excelente alternativa para cultivos em larga escala.

*Messastrum gracile* apresenta grande aceitação pelos organismos aquáticos, já que apresenta uma facilidade em seu cultivo laboratorial em razão do seu rápido

crescimento, seu tamanho, qualidade nutricional, espessura de parede celular e também por resistir a condições adversas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

### **3.2 Microalgas como agente antioxidante**

Os antioxidantes são compostos que em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, tem a capacidade de inibir ou prevenir significativamente a oxidação do substrato (FRANKEL & MEYER, 2000), ou seja, são responsáveis por protegerem as células contra os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são produzidas naturalmente no metabolismo dos organismos, seja vegetal ou animal e, em condições de estresse, podem ser produzidas em excesso, gerando o estresse oxidativo (GUARIENTI et al., 2010).

O estresse oxidativo pode ser altamente reativo no organismo, sendo capaz de provocar diversos malefícios, desde ataques aos lipídeos, proteínas e DNA (BARREIROS, et al., 2006), até a produção de doenças como diabetes, hipertensão, câncer, obesidade e transtornos neurodegenerativos (BARBOSA et al., 2010).

Para combater as espécies reativas de oxigênio e consequentemente, a produção do estresse oxidativo, os organismos são munidos de um sistema de defesa antioxidante que é capaz de neutralizar os radicais livres gerados nas células. Esse sistema é composto por um maquinário enzimático e não enzimático, entre eles a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), catalase (CAT, 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GSH-px, EC 1.11.1.9), guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) (GRATÃO et al., 2005; GRATÃO et al., 2008).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa frente as espécies reativas de oxigênio, dismutando dois superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), em que um é reduzido gerando  $H_2O_2$  e o outro é oxidado formando  $O_2$  (GRATÃO et al., 2005). Com isso diminui o risco de formação de hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) a partir do  $O_2^{\bullet-}$  (DINAKAR et al., 2012).

A enzima Catalase é a principal encarregada da eliminação do  $H_2O_2$  produzido durante a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e a fotorrespiração. É capaz de converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e oxigênio (HELDT & HELDT, 2005; DUBEY, 2011) e é efetiva principalmente quando ocorre alto nível de estresse, em que o índice de  $H_2O_2$  (mM)

é muito elevado, sendo então indispensável contra as espécies reativas de oxigênio (DUBEY, 2011).

Já a glutathione peroxidase é a responsável por oxidar a glutathione (GSH) e transforma-la em glutathione oxidada (GSSG). Neste processo, ocorre a quebra do peróxido em álcool, principalmente quando o  $H_2O_2$  se encontra em pequenas porções, já que esta enzima possui uma grande afinidade pelo peróxido de hidrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Outra enzima de grande importância no ciclo ascobato-glutathione é a glutathione redutase, que utiliza o NADPH para reduzir a glutathione oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH), removendo  $H_2O_2$  em diferentes componentes celulares (GRATÃO et al., 2005). A Gr e a GSH-px são enzimas que se completam para manter em equilíbrio a relação entre GSH e GSSG no organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Entretanto, em determinadas situações, em que o estresse é extremamente elevado, o sistema de defesa antioxidante do organismo não é suficiente, sendo necessário suplementar com antioxidantes exógenos (GUARIENTI et al., 2010).

As microalgas são organismos microscópicos, compostos de inúmeros micronutrientes e macronutrientes cada vez mais utilizados em diversos tipos de indústrias (BARBOSA et al., 2014). São capazes de converter energia luminosa em energia química através da fotossíntese, absorvendo luz ultravioleta e gerando oxigênio, que poderá atingir suas células e produzir as ERO nos cloroplastos. Também produzem as espécies reativas de oxigênio durante a respiração aeróbica, nas mitocôndrias. Devido a esses processos, as microalgas apresentam uma potente linha de defesa, composta por antioxidantes capazes de minimizar os danos produzidos pelas ERO (MACHADO, 2011).

Entretanto, ainda não se sabe a diversidade de microalgas que apresentam os compostos antioxidantes capazes de exercer atividade biológica. Diversos estudos vêm sendo realizados para entender o processo e a composição dos antioxidantes presentes nas mais diversas microalgas (MACHADO, 2011).

Shanab et al. (2012) já demonstraram que boa parte das microalgas apresentam ao menos compostos fenólicos capazes de minimizar o estresse oxidativo. As substâncias fenólicas, que são compostos antioxidantes não enzimáticos que estão presentes na biomassa das microalgas, têm um são sintetizadas em maior quantidade quando expostas a luz ultravioleta. Este fato,

demonstra que estes compostos tem um papel na resposta antioxidante frente ao estresse luminoso (DUVAL et al., 1999). Jaime et al. (2005), Geetha et al. (2010) e Custódio et al. (2012) observaram em seus estudos que os compostos fenólicos de algumas microalgas apresentavam alta capacidade antioxidante.

Shanab et al. (2012) observaram que a Cyanobacteria *Spirulina platensis* possui alta taxa de antioxidante e moderada eficiência anticancerígena devido aos pigmentos de ficobiliproteína que a constitui. O meio de cultura é outro fator que tem influência direta na produção de antioxidante principalmente, em relação a concentração de nitrato como no cultivo de *Nostoc muscorum* e *Oscillatoria* sp.

Goh et al. (2010) observaram em seus estudos que o extrato de *Chaetoceros* sp. apresentou capacidade antioxidante em relação a redução e eliminação de radicais livres. Cai et al. (2004) notaram que a atividade antioxidante da Chlorophyceae *Tetraselmis* sp. foi superior a encontrada em plantas medicinais e vários frutos e vegetais, demonstrando alto potencial antioxidante da microalga.

As microalgas também contem carotenoides, que são importantes classe de antioxidantes. Os carotenoides eliminam as espécies reativas de oxigênio (ERO) que são geradas durante o processo de respiração e fotossíntese e proteger o aparato fotossintético (TAKAICHI, 2011).

Um exemplo de carotenoide bastante conhecido é a luteína; por meio de diversos métodos Guedes et al. (2013) identificaram que a microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou elevadas concentrações de antioxidantes, que podem estar associadas a luteína.

Outro exemplo de carotenoide é a fucoxantina, pigmento alaranjado, que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, anti-obesidade e antidiabética (PENG et al., 2011). Este carotenoide também apresentou efeito contra a lesão celular neuronal, atrasando o efeito da incidência de sinais de AVC, por meio da capacidade de eliminar radicais livres (IKEDA et al., 2003).

Em relação aos danos diretos provocados aos organismos e ao controle de doenças por meio de antioxidantes, foram relatados alguns estudos, como por exemplo o de Karawita et al. (2007), que estudaram algumas microalgas e constataram a ação antioxidante contra a ação danosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao DNA de linfoma de camundongo.

Uma pesquisa realizada por Deng & Chow (2010), utilizando *Spirulina* sp. demonstrou que a mesma apresentou atividade antioxidante e antiinflamatória,

sendo capaz de controlar doenças cardiovasculares. Além disso, exibiu efeito protetor sobre a glutathiona peroxidase (GSH-px), glutathiona peroxidase dependente de selênio (GPX-Se) e oxidada glutathiona redutase (GR), que são importantes enzimas antioxidantes.

Os antioxidantes naturais provenientes das microalgas também são utilizados na alimentação humana e animal, além de produtos de cosméticos. Athukorala et al. (2005) e Cox & Abu-Ghannam (2013) utilizaram extratos de microalgas para avaliar o potencial antioxidante e conservante alimentício e obtiveram resultados satisfatórios. Também foram acrescentadas espécies de microalgas em alimentos como extrusado de milho e emulsão de carne, conferindo maior potencial antioxidante para ambos e menor teor de sal para a emulsão de carne (CIAN et al., 2014; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2009). Ortiz et al. (2014), obtiveram melhores resultados quando utilizaram extratos de microalgas para manter a conservação e diminuir a peroxidação de salmão enlatado.

Nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, os antioxidantes provenientes de microalgas são utilizados para proteção da pele contra os raios UV, prevenir o envelhecimento da pele e inibir a síntese de melanina (WANG et al., 2015).

### **3.3 Importância e cultivo da microalga**

As microalgas são organismos capazes de converter a energia luminosa em energia química através do processo de fotossíntese e, por meio desse processo, produzem e liberam oxigênio para a atmosfera (SHANAB, et al., 2012). Durante o processo de absorção e conversão do CO<sub>2</sub> em matéria orgânica, as microalgas desempenham um importante papel ambiental, diminuindo o acúmulo de gases na atmosfera e auxiliando contra o efeito estufa (OHSE et al., 2007).

Fazem parte de um nível trófico, consideradas produtores primárias e por isso, são organismos extremamente importantes para o ecossistema, servindo de fonte de alimento para diversas espécies, desempenhando um papel ecológico de grande importância (BARCELLOS, 2012). Além disso, apresentam grande variedade de produtos metabólicos, como por exemplo, enzimas, toxinas, pigmentos, vitaminas, carotenoides que podem ser utilizados para tratamento de águas residuais e na produção de diversos produtos utilizados no cotidiano humano (PEREZ-GARCIA et al., 2011; ZHANG et al., 2004).

Podem apresentar entre 40 e 70% de teor protéico dependendo da espécie e altas concentrações de lipídeos que podem ser fonte de matéria-prima para borracha, tecidos e detergentes. Somado a seus nutrientes, as microalgas têm os benefícios de serem produzidas de forma contínua, ocupar pequenas áreas e ter fácil cultivo, tudo isso conferindo para a mesma uma importante alternativa proteica e uma possível diminuição no uso de petróleo e de gorduras animais e vegetais (BERTOLDI et al., 2008).

Estes microrganismos fotossintetizantes são utilizados para avaliar sistemas aquáticos, já que são diretamente afetadas pelos efluentes residenciais, industriais e químicos, que contêm nitrogênio e fósforo. Se o ambiente aquático apresenta grandes quantidades desses nutrientes, as microalgas aumentam sua multiplicação, podendo haver floração e deterioração da água (VIDOTTI et al., 2004).

Outro papel das microalgas é a capacidade de bio sorção, ou seja, absorver metais tóxicos de efluentes (QUINTELAS et al., 2008). Estudos demonstraram a diminuição de cromo, zinco, cádmio, entre outros metais pesados, quando utilizada espécies de microalga no tratamento de água. (DAL MAGRO et al., 2013; ANEJA et al., 2010; SIVA KIRAN et al., 2012).

Uma importante aplicação de algumas microalgas é em relação ao pigmento produzido. De acordo com Sirakov et al. (2015), microalgas como *Dunaliella salina*, *Chlorella* sp., *Hematococcus pluvialis* e *Spirulina* sp. fornecem pigmentos que podem ser utilizados nas culturas do camarão, peixe salmonídeo e peixes ornamentais, em que, ao ingerir a microalga, apresentam uma colocação mais acentuada. Também são utilizadas na aquicultura como um alimento vivo para moluscos, como por exemplo ostras e mexilhões e para larvas de crustáceos, alguns peixes e zooplâncton (BROWN, 2012). Berchielli-Morais et al. (2015), utilizaram *Ankistrodesmus gracilis* e *Haematococcus pluvialis* como fonte de alimento para peixes ornamentais, obtendo importantes resultados em relação a crescimento, sobrevivência e coloração nas dietas suplementadas com as microalgas.

Além disso, a *Messastrum gracile* pode ser uma importante fonte de alimentação para larvas, alevinos de peixes e para espécies de Cladocera e, quando cultivada em meio com custo mais baixo como o NPK e meios fabricados com plantas aquáticas, se torna uma importante fonte de proteína, com crescimento

rápido e barato (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2001). A microalga também pode ser inserida na ração convencional, resultando em um alimento que proporcione maior crescimento, ganho de peso e peso final para algumas espécies de peixes (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2016; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2019a).

As microalgas também desempenham importante e inovadora alternativa na produção de biodiesel devido aos seus altos teores de lipídeos e as características físico-químicas dos seus óleos, sendo fontes naturais e com efluentes menos agressivos. Além disso são capazes de produzir grandes quantidades de óleos em áreas reduzidas e, por seu desenvolvimento ocorrer em ambiente aquático, não comprometem a disponibilidade de alimento em solo, diferenciando por exemplo, da cana-de-açúcar e do milho (CARNEIRO et al., 2018).

Devido à grande quantidade de nutrientes disponíveis, as microalgas são utilizadas em diversos ramos da indústria. Nas indústrias de cosméticos as microalgas são comercializadas congeladas e disponibilizam matéria prima para a produção de cosméticos antienvelhecimento, por conta da sua alta produção de ácidos graxos e proteínas. Também são utilizadas na elaboração de alimentos funcionais, devido a quantidade de carboidratos e proteínas disponíveis (MARIANO, 2014).

As indústrias de alimentos também utilizam as microalgas como fonte de produtos comercializados para a alimentação humana. As algas marinhas podem ser utilizadas como emulsificantes, estabilizantes e gelificantes, além de promover estabilidade em coberturas de chocolate, “marshmallow” e balas de goma (EL GAMAL, 2010).

São cultivadas para produzir compostos marcados com isótopos estáveis para utilização em investigação médica e diagnóstico. As microalgas marrons também contêm polissacarídeos sulfatados, que tem demonstrado ser um importante anticoagulante, podendo substituir a heparina, proveniente de suínos e bovinos (RADMER, 1996). Além disso são utilizadas para tratamento de doenças cardíacas e inflamatórias; asma, artrite, enxaqueca e psoríase. A microalga *Chlorella*, devido à alta produção de clorofila e sua capacidade quelante, pode ser usada em pomada, tratamento para benefícios farmacêuticos, especialmente recuperação de fígado e tratamento de úlcera (HARUN et al., 2010).

Além do mais, diferentes espécies de microalgas podem apresentar importantes respostas nas atividades de redução de colesterol, atividade anti-inflamatória, anticancerígena, antibacterianas e antidiabéticas, principalmente por serem compostas de esteroides que são classe de lipídeos que estão presentes nos organismos eucarióticos (LUO et al., 2015).

Para a área agrônômica, as algas são utilizadas como fertilizantes e larvicidas, as Cyanobacterias são fixadoras de nitrogênio e podem ser usadas como fertilizante, especialmente no cultivo de arroz (VAISHAMPAYAN et al., 2001). Microalgas tais como *Chlorella* sp. têm sido usadas para melhorar a retenção de água no solo e a disponibilizar nutrientes para as plantas (METTING, 1988). Além de seu uso como biofertilizantes, Cyanobacterias e microalgas mostraram produzir fitohormônios promotores de crescimento de plantas (HASHTROUDI et al., 2013).

### **3.4 Influência da luminosidade em microalgas**

As microalgas podem sofrer influência de diferentes formas no meio em que se encontram, através de fatores químicos, físicos e biológicos. Esses fatores são capazes de influenciar no crescimento do microrganismo, podendo inibi-lo ou promover seu crescimento (RAVEN et al., 1999).

A luminosidade, pode ser um fator capaz de interferir no desenvolvimento das microalgas, já que são organismos fototróficos e dependem da luz para completar o seu ciclo de vida e fixar carbono (CARVALHO et al., 2011). A luz fornece energia para as reações fotossintetizantes e estimulam a conversão dos nutrientes inorgânicos do meio em biomassa algal (SUTHERLAND et al., 2015).

A intensidade luminosa é um componente essencial da fotossíntese, participando da etapa fotoquímica, em que possibilita a síntese de oxigênio e de carboidrato a partir da água e do dióxido de carbono (CORRÊA, 2015). Por isso o nível de intensidade luminosa é um fator limitante que poderá acarretar mudanças em seu crescimento, bioquímica e metabolismo (JANSSEN et al., 2003).

Em ambiente natural as microalgas sofrem com a variação rápidas de luminosidade ao longo do dia e na coluna d'água, tendo uma capacidade de fotoaclimatação, otimizando o uso da luz que está disponível. Apesar disso, mudanças bruscas de sombra para alta intensidade luminosa podem gerar danos celulares e no DNA e levar a morte, principalmente em microalgas que não apresentam flagelo para a movimentação (CARVALHO et al., 2011).

Em cultivo laboratorial são comumente utilizadas luzes artificiais fluorescentes que é de fácil controle, com maior incidência e homogeneidade no cultivo, já que a iluminação ao atingir todos os ângulos do recipiente propicia oportunidade da célula absorver mais energia para a fotossíntese. Com o controle da luminosidade é possível retardar ou acelerar o crescimento da microalga e modificar os metabolitos gerados (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001; LOURENÇO, 2006)

Sob alta intensidade luminosa os pigmentos são, em sua maioria, produzidos em maior quantidade e modificam sua função de pigmento acessório para proteção da clorofila *a*, estabilizando o aparato fotossintetizante (OLAIZOLA e DUERR, 1990). Além disso, espécies de microalga podem utilizar a alta disponibilidade luz para acumular lipídeo e proteína e até melhorar sua taxa de crescimento em resposta ao estresse (KRZEMIŃSKA et al., 2015).

Entretanto, se a microalga for exposta a luminosidade em excesso, em que seu sistema de defesa não seja mais efetivo, poderá ocorrer a fotoinibição, ou seja, a inibição da fotossíntese provocada pelo excedente de luz (CORRÊA, 2015). Além disso, a abundância de luminosidade poderá gerar a fotoxidação, provocado pela formação de peróxido de hidrogênio, ocasionando a morte das células (HIRAYAMA et al., 1996).

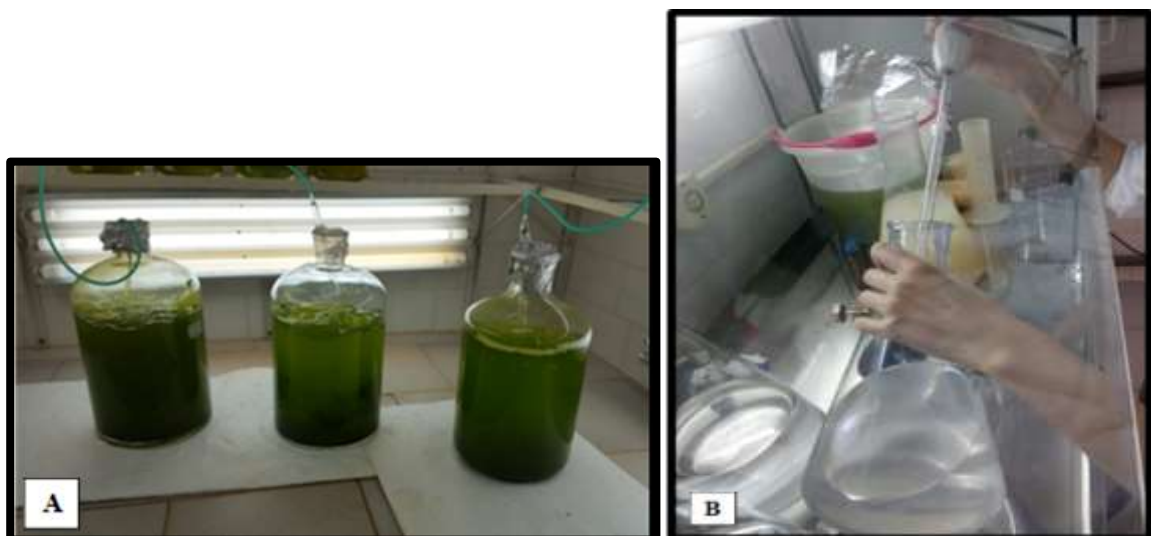
Alguns estudos vêm utilizando a luz UV como fonte de luminosidade para o cultivo de microalgas ou também como fonte de estresse e produção de enzimas e carotenoides, devido ao estresse oxidativo provocado pelo excesso de luminosidade ter como produto o acúmulo de carotenoides, a produção de espécies reativas e consequentemente a estimulação de enzimas (JAHNKE, 1999; KOVÁČIK et al., 2010). Entretanto em ambientes naturais, a luz UV pode prejudicar a motilidade e orientação das microalgas, impossibilitando a migração ao longo da coluna d'água para encontrar melhores condições de desenvolvimento (MA et al., 2012).

#### 4. DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO E ANÁLISE DE ANTIOXIDANTE

A pesquisa foi realizada no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, no laboratório de Limnologia e Produção de Plânctons e as análises de antioxidantes foram realizadas no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP.

Um dos setores do laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton é o de cultivo de microalgas, que possui uma área total de 28,43 m<sup>2</sup> compreendendo uma sala de assepsia e um cepário onde são mantidas as culturas de microalgas. O cepário foi construído com pisos de cerâmica de cor gelo, paredes revestidas de azulejos brancos, contendo prateleiras de estrutura vazada que permitem a máxima passagem da luz e um sistema de cultivo com condições artificiais de iluminação, aeração e temperatura. A iluminação é composta por lâmpadas fluorescentes e distribuídas de forma intercalada atingindo todos os ângulos do cepário. A refrigeração é mantida de forma constante por um ar condicionado e a aeração é fornecida por um sistema artificial de compressores e filtros de ar diminuindo o risco de contaminação das culturas (Figura 2-A)

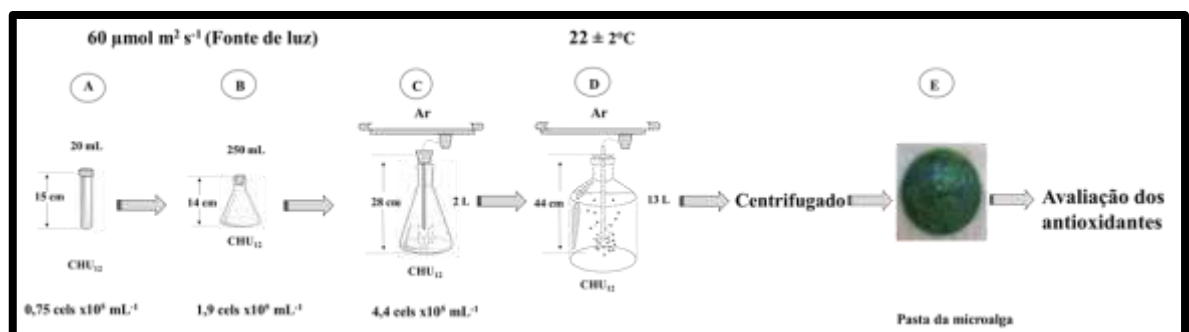
Figura 2: Demonstração dos cultivos da microalga *Messastrum gracile*: A- Cultivo no laboratório em volume de 2L e 10L; B- Repicagem da microalga para cultivo e avaliação da biomassa.



O método de cultivo utilizado foi o *batch* ou estático que consiste na transferência das culturas, antes de atingirem a fase estacionária de crescimento, para volumes crescentes de água enriquecida com nutrientes. Ao atingir a máxima densidade celular, a suspensão de células pode ser utilizada para fins de bioensaio ou para transferência a volumes maiores. Assim as microalgas foram mantidas em cepas de 10 ml e para o cultivo experimental foram cultivadas para volumes maiores. No caso deste experimento foram utilizados diferentes volumes até alcançar o volume de 10 L, sendo cultivado em triplicatas em galão de vidro durante todo o experimento (Figura 3). Neste experimento, até 10 L de volume, a microalga foi cultivada a  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidade de luz, onde normalmente é cultivada com elevada biomassa.

Para cultivo em laboratório, somente a água não é suficiente para sustentar o crescimento algal, principalmente devido a deficiência de alguns nutrientes, presentes apenas em quantidades mínimas ou traço. Tem se constatado que o meio artificial fornece resultados mais constantes para a cultura algal quando comparada a água natural (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993). O meio de cultura utilizado foi o CHU<sub>12</sub> que é um meio comercial preparado a base de vários reagentes químicos:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{K}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KCl,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SiO}_3$ , Biotina e que posteriormente foram diluídos em 1400 mL de água destilada e autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Apesar do custo mais elevado, foi escolhido esse meio de cultura devido ao fato de análises de antioxidantes não terem sido realizadas nesta espécie, então o meio de cultura comercial apresentaria bons resultados de desenvolvimento, não interferindo nos resultados do trabalho (Figura 2-B)

Figura 3. Diagrama esquemático do cultivo da microalga *Messastrum gracile* em diferentes fases de crescimento para a produção da biomassa algal. A- Inóculo da microalga (cepa). B- Aumento da biomassa transferindo para erlenmeyer de 250 ml. C- Avaliação do crescimento da microalga no volume de 2 L. D- Cultivo em volume de 13 L para centrifugação. E- Biomassa algal centrifugada para posterior avaliação de antioxidante.



Para o experimento de cultivo sem estresse luminoso, as microalgas foram mantidas durante todo o experimento em intensidade luminosa de  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , em que comumente são cultivadas e foram coletadas em quatro períodos da curva de crescimento da microalga (7, 14, 21, 28 dias). Durante a coleta, as microalgas eram centrifugadas para a obtenção de uma pasta úmida e congeladas em freezer  $-20^\circ$ .

No experimento de estresse luminoso, as microalgas foram cultivadas em intensidade de luz de  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  desde o início do cultivo e só foram transferidas para uma intensidade luminosa duas vezes maior ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), 24 ou 72 horas antes de serem coletadas nos dias de crescimento 7, 14, 21 e 28, para a obtenção da pasta úmida. A intensidade de luz de ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) foi estabelecida por testes preliminares e para alcançar tal intensidade, foram colocadas lâmpadas dos dois lados do galão de vidro (Figura 4).

Figura 4: Imagens do cultivo da microalga *Messastrum gracile* em condições de estresse em função da elevação da luminosidade ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

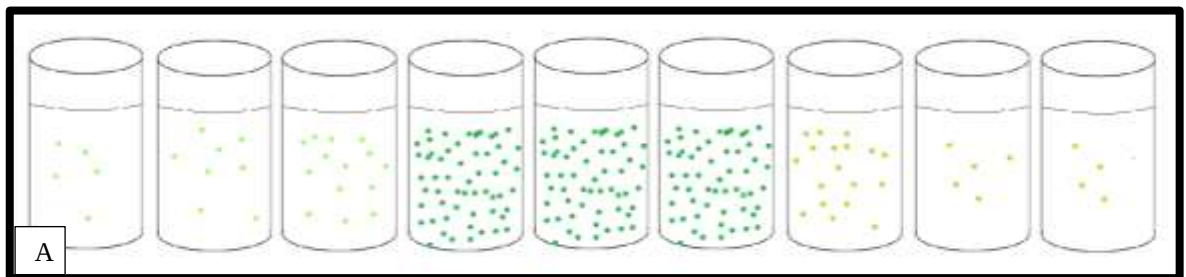


A escolha por estes diferentes dias representam cada fase da curva de crescimento da microalga cultivada em condições laboratoriais. Nem sempre a microalga atinge a fase de senescência (morte) pois as condições adequadas de  $\text{CO}_2$ , temperatura e nutrientes (meio de cultura) permitem que as microalgas continuem crescendo, porém em baixa biomassa. O crescimento da microalga passa por cinco fases distintas:

- Fase de indução ou *lag* em que a maioria das células são viáveis, mas não estão em condições de se dividir imediatamente;

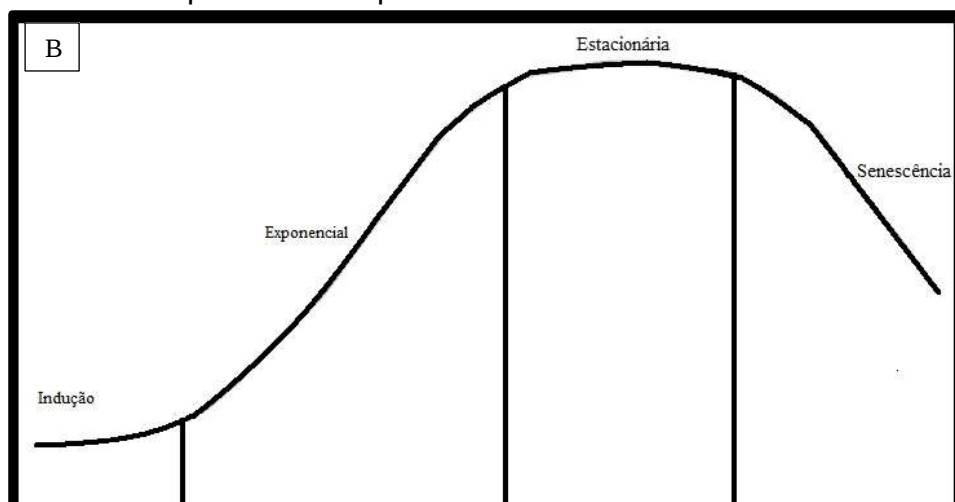
- Fase exponencial ou *log* em que ocorre maior produção de proteína e divisão constante, alcançando a taxa de crescimento máxima.
- Fase de redução do crescimento em que o tempo para a duplicação celular aumenta, reduzindo a taxa de crescimento;
- Fase estacionária na qual a população não aumenta, pois, a taxa de crescimento se equivale a taxa de mortalidade e por último;
- Fase senescente ou de declínio em que a taxa de mortalidade das células é maior que a taxa de reprodução e formação de novas células (Figura 5 A-B) (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Figura 5: Diferentes fases da curva de crescimento de microalgas em sistemas de cultivo tipo *Batch*. A- Demonstração da densidade algal ao longo da curva de crescimento



Fonte: Adaptado de Sipaúba-Tavares & Rocha (2001)

B- Desenho esquemático do padrão da curva de crescimento da microalga



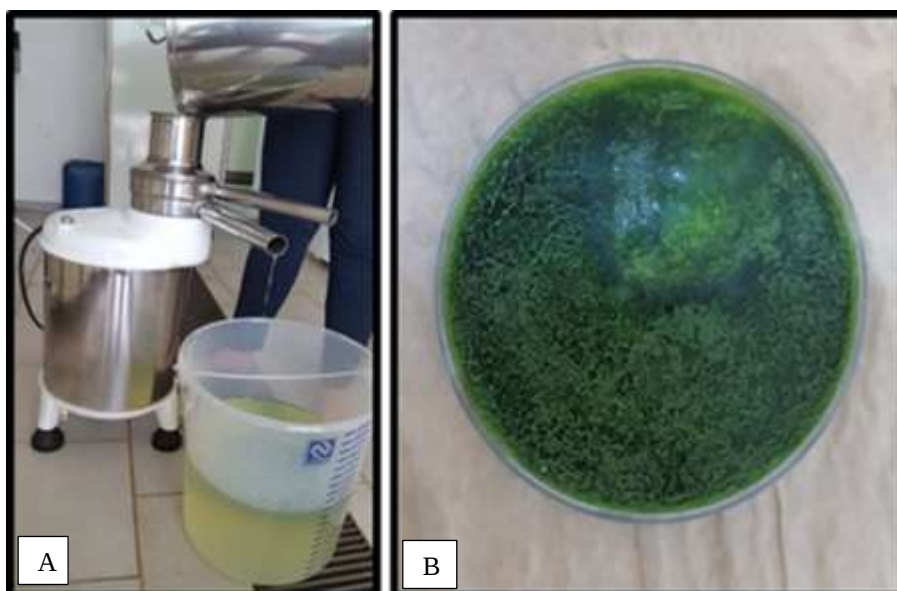
Fonte: Adaptado de Sipaúba-Tavares & Rocha (2001)

Os antioxidantes analisados foram a Catalase (CAT), Guaiacol Peroxidase (GPOX), Glutationa Peroxidase (GSH-px), Glutationa Redutase (GR) e Superóxido Dismutase (SOD). A escolha destes antioxidantes está relacionada com a

metodologia existente e aplicada em plantas no Laboratório de Fisiologia, do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária (UNESP-FCAV).

Como nada havia sido testado com esta microalga a respeito de análise de antioxidantes inicialmente foi utilizada a forma líquida e, não sendo possível a obtenção dos antioxidantes, uma vez que os níveis de proteína e antioxidantes foram inferiores ao necessário para serem detectados na metodologia empregada, optou-se pela centrifugação e utilização da biomassa algal em pasta, alcançando os resultados satisfatórios (Figura 6).

Figura 6: Processo de centrifugação da *M. gracile* (A) e o resultado do processo, em que a microalga está na forma de pasta (B).



O uso da forma líquida seguiu o protocolo de Martins (2011) e para a pasta foram testadas 4 metodologias de Guedes et al. (2011); Fan et al. (2018); Hamed et al. (2017); Gomes-Junior et al. (2007) e a que apresentou os melhores resultados para a obtenção dos antioxidantes estudados foi a metodologia baseada em Fan et al. (2019).

Para a utilização na forma de pasta da microalga foi utilizada uma desnatadeira a qual permite uma melhor centrifugação sem ocorrer lise das células (Figura 3 e 4).

O protocolo de Fan et al. (2018), não mencionava a quantidade de microalga que deveria ser utilizada para o processo de extração, sendo necessário realizar testes para adequar o peso necessário para as futuras análises. Depois de

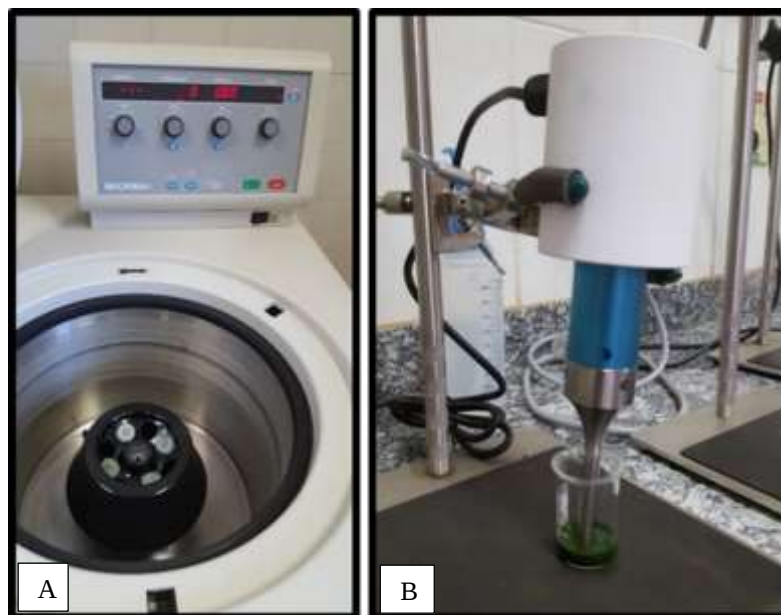
avaliações preliminares foi estabelecido 5 gramas de microalga em pasta, mensuradas em balança analítica com precisão de 0,0001 g.

Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante gerado descartado (FAN et al., 2019). No mesmo protocolo, o autor adicionava uma solução de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,6), entretanto não mencionava qual o tampão fosfato utilizado (monobásico ou dibásico) e novamente não abordava a quantidade necessária. Assim, após testes preliminares foi estipulado o tampão fosfato de potássio monobásico no volume 2,5 ml, gerando uma proporção final com a microalga de 2:1.

Durante o teste inicial de todos os protocolos, foi observado que o processo de sonicação (lise da célula por ultra-som) aumentava o resultado de proteína total final, então, apesar de não constar no protocolo de Fan et al (2019), foi adicionado o processo de sonicação ao estudo, em que a microalga acrescida da solução tampão foi sonicada por 3 vezes com intervalos de 20 segundos entre cada etapa (Figura 5).

Posteriormente o protocolo de Fan et al. (2019) foi seguido para o processo de centrifugar a pasta a 13.800 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante gerado foi armazenado em freezer -80 °C (Figura 7 A-B).

Figura 7: Microalga sendo centrifugada (A) e sonicada para posterior extração dos antioxidantes (B).



Para a avaliação dos antioxidantes foi determinado níveis de proteínas totais segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine sérum albumin”) como padrão para a utilização desse valor no cálculo dos antioxidantes.

Na avaliação dos antioxidantes foram realizadas as análises de CAT (AZEVEDO et al., 1998), GPOX (MATSUNO & URITANI, 1972), GSH-px (FLOHÉ & CÜNZLER, 1984), GR (GOMES-JUNIOR et al., 2006) e SOD (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977).

## 5. REFERÊNCIA

ABELIOVICH, A.; SHILO, M. Photooxidative reactions of c-phycocyanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v. 283, n. 3; p. 483-491, 1972.

ANEJA, R. K.; CHAUDHARY, G.; AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Biosorption of Pb<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by non-living biomass of *Spirulina* sp. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 438-442, 2010.

ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, M. E. Cultivation of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* in bench scale using medium contaminated with heavy metals. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 603-608, 2016.

ATHUKORALA, Y.; LEE, K. W.; PARK, E. J.; HEO, M. S.; YEO, I. K.; LEE, Y. D.; JEON, Y. J. Reduction of lipid peroxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated DNA damage by a red alga (*Grateloupia filicina*) methanolic extract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2341–2348, 2005.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BACHION, M. A. **Estudo do crescimento e desenvolvimento populacional de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura Jaboticabal), 1996.

BARBOSA M. R; SILVA M. M. A; WILLADINO L; ULISSES C; CAMARA T. C. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARBOSA, K. B.; COSTA, N. M.; ALFENAS, R. C.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARCELLOS, A. D.; BARRETO, A. G. S. S.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I. Microalgas e seu potencial de uso. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 4, p. 178-184, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERCHIELLI-MORAIS, F. A.; FERNANDES, J. B. K.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 10, p. 3061-3069, 2015.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **Digital Library of Journals**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. **Rima**, p. 502, 2006.

BOCK, C. **Genetic diversity and polyphyletic origin of the Dictyosphaerium morphotype**. Freie Universität Berlin, Germany, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-259, 1976.

BROWN, M. R., Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). **Avances en Nutrición Acuicola VI**. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 2002.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n.17, p. 2157–2184, 2004.

CARNEIRO, G. A.; SILVA, J. J. R.; OLIVEIRA, G. A.; PIO, F. P. B. Uso de Microalgas para Produção de Biodiesel. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 5, p. 01-12, 2018.

CARVALHO, A. P.; SILVA, S. O.; BAPTISTA, J. M.; MALCATA, F.X. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 1275 – 1288, 2011.

CHAPMAN, R. L.; BUCHHEIM, M. A.; DELWICHE, C. F.; FRIEDL, T.; HUSS, V. A; KAROL, K. G.; LEWIS, L. A.; MANHART, J.; MCCOURT, R. M.; OLSEN, J. L. Molecular systematics of the green algae Molecular systematics of plants II. **Springer**, p. 508-540, 1998.

CIAN, R. E.; CABALLERO, M. S.; SABBAG, N.; GONZÁLEZ, R. J.; DRAGO, S. R. Bio-accessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Porphyra columbina*. **LWT—Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 51–58, 2014.

CORRÊA, D. O. Desenvolvimento e caracterização do cultivo de microalgas em fotobiorreator alimentado por emissões gasosas de motores. **Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais**, Universidade Federal do Paraná, 2015.

COX, S.; ABU-GHANNAM, N. Incorporation of *himanthalia elongata* seaweed to enhance the phytochemical content of breadsticks using response surface

methodology (RSM). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, p. 1537–1545, 2013.

CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARRADAS, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 134-140, 2012.

DAL MAGRO, C.; DEON, M. C.; THOMÉ, A.; PICCIN, J. S.; COLLA, L. M. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. **Química Nova**, v. 36, n. 8, 2013.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2011.

DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 33- 45, 2010.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfeld: **Science Publishers**, v. 9, n. 1, p. 178-203, 2011.

DUVAL, B.; SHETTY, K.; THOMAS, W. H. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, n. 6, p. 559–566, 1999.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.

ESTEVES, F.A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro. **Interciência**, 2011.

FAN, H.; LIU, H.; DONG, Y.; CHEN, C.; WANG, Z. GUO, J.; DU, S. Growth inhibition and oxidative stress caused by four ionic liquids in *Scenedesmus obliquus*: Role of cations and anions. **Science of The Total Environment**, v. 651, n. 1, p. 570-579, 2018.

FIORESI, T. B.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. . Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. **Biotemas (UFSC)**, v. 21, p. 7-16, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n.13, p. 1925-1941, 2000.

FRIEDL, T. The evolution of the green algae. **Plant systems Evolution [Supplement]**, v. 11, p. 87-101, 1997.

GARCIA, I. R.; GUERREIRO, J. L. G. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods, **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1023-1026, 2008.

GARCIA, T. S.; BOCK, C.; SANT'ANNA, C. L.; BAGATINI, I. L.; WODNIOK, S.; VIERIRA, A. H. 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**, v. 17, n. 1, p. 1-19, 2016.

GARCÍA-ROMERAL, J.; PAVÍA-GÓMEZ, M.; GARCÍA SANZ, T.; CHIRIVELLA-MARTORELL, J.; SERRANO-AROCA, A. Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. **Nereis**, n. 9, p. 115-129, 2017.

GEETHA, B. V.; NAVASAKTHI, R.; PADMINI, E. Investigation of antioxidant capacity and phytochemical composition of Sun Chlorella -an in vitro study. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2010.

GEORGE, B.; PANCHAL, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWALA, C.; GHOSH, T. MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Super oxide dismutases: I. Occurrence in higherplants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOH, S. H.; YUSOFF, F. M.; LOH, S. P. A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom, *Chaetoceros* sp. and a Green Microalga, *Nannochloropsis* sp. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 3, 2010.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 5, p. 449–456, 2007.

GOMES-JUNIOR, R.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

GRATÃO, P. L.; PRASAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 53-64, 2005.

GUARIENTI C.; BERTOLIN T. E.; COSTA J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 1, p. 106-111, 2010.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; PEREIRA, R. D.; MALCATA, F. X. Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 5, p.1218-1224, 2011.

GUEDES, A. C.; GIÃO, M. S.; SEABRA, R. FERREIRA, A. C. S.; TAMAGNINI, P.; MORADAS-FERREIRA, P.; MALCATA, F. X. Evaluation of the Antioxidant Activity of Cell Extracts from Microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1256-1270, 2013.

GUIRY, M. D; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. Publicação eletrônica mundial, Universidade Nacional da Irlanda, Galway. <http://www.algaebase.org>; pesquisado em 03 de outubro de 2019.

GULDHE, A.; ANSARI, F.A.; SINGH, P.; BUX, F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 47-53, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v. 1, n. 1, p. 1- 851, 2007.

HAMED, S. M.; SELIM, S.; Klöck, G.; AbdElgawad, H. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 19-25, 2017.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HASHTROUDI, M.; GHASSEMPOUR, A.; RIAHI, H.; SHARIATMADARI, Z.; KHANJIR, M. Endogenous auxins in plant growth-promoting cyanobacteria – *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 2, p. 379-386, 2013.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: HELDT, H.W. **Plant Biochemistry**, v. 4, p. 435-454, 2005.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, R. K. Evaluation of Active Oxygen Effect on Photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Research**, v. 25, n. 3, p. 247 – 257, 1996.

HORTA, P. A. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

IKEDA, K.; KITAMURA, A.; MACHIDA, H.; WATANABE, M.; NEGISHI, H.; HIRAOKA, J.; NAKANO, T. Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 1-2, p. 44-48, 2003.

IZZO, M.; STAHL, C.; TUAZON, M. Using Cellulose Gel and Carrageenan to Lower Fat and Calories in Confections. **Food Technology**, v. 7, p. 45-48, 1995.

JAHNKE, L. S. Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 48, n. 1, p. 68-74, 1999.

JAIME, L.; MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; SOLER-RIVAS, C.; SANTOYO, S.; SEÑORANS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Separation and characterization

of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 16, p. 2111–2119, 2005.

JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 193 – 210, 2003.

KARAWITA, R.; SENEVIRATHNE, M.; ATHUKORALA, Y.; AFFAN, A.; LEE, Y. J.; KIM, S. K.; LEE, J. B.; JEON, Y. J. Protective Effect of Enzymatic Extracts from Microalgae Against DNA Damage Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 479- 490, 2007.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; BACKOR, M. Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 612–616, 2010.

KRZEMIŃSKA, I., PIASECKA, A., NOSALEWICZ, A., SIMIONATO, D., & WAWRZYKOWSKI, J. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. **Bioresource technology**, v. 196, p. 72-77, 2015.

LÓPEZ-LÓPEZ, I.; BASTIDA, S.; RUIZ-CAPILLAS, C.; LARREA, M. T.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.; COFRADES, S.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. **Meat Science**, v. 83, n. 3, p. 492–498, 2009.

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

LUO, X.; SU, P.; ZHANG, W. Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, p. 4231-4254, 2015.

MA, Z.; HELBLING, E. W.; LI, W.; VILLAFañE, V. E.; GAO, K. Motility and photosynthetic responses of the green microalga *Tetraselmis subcordiformis* to visible and UV light levels. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 6, p. 1613-1621, 2012.

MACHADO, T. W. M. Estrutura química de polissacarídeos e atividade antioxidante de extratos de microalgas marinhas. **Dissertação de Mestrado**, Curitiba, 2011.

MARIANO, V. L. B. Aquicultura de microalgas. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Paraná. 2014.

MARTINS, P. L. G. Avaliação da microalga marinha *Lingulodinium Polyedrum* exposta ao fenol: biotransformação e atividade antioxidante. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091- 1101, 1972.

METTING, B.; Micro-algae in agriculture. In: Borowitzka MA, **Borowitzka LJ (eds) Microalgal biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 288–304. 1988.

MOLDES, C.A.; MEDICI, L.O.; ABRAHÃO, O.S.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 469-479, 2008.

MORIOKA, L. R. I.; MATOS, A. P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E. S. Floculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44–49, 2014.

OHSE, S.; DERNER, R.B.; OZÓRIO, R.A.; CUNHA, P.C.R.; LAMARCA, C.P.; SANTOS, M.E.; MENDES, L.B.B. Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula**, v. 36, ISSN 2178-4574, p. 39-74, 2007.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O. Effect of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, n. 2, p. 97-104, 1990.

ORTIZ, J; VIVANCO, J. P.; AUBOURG, S. P. Lipid and sensory quality of canned Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect of the use of different seaweed extracts as covering liquids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 5, p. 596-605, 2014.

PANIANGUA, L. M. **El Tecnitatl. Concentrado de algas *Spirulina* frente de proteínas comestibles Del pueblo de los Aztecas**. México, p. 1-8, 2003.

PENG, J.; YUAN, J. P.; WU, C. F.; WANG, J. H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1806-1828, 2011.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolismo and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

QUINTELAS, C.; FERNANDES, B.; CASTRO, J.; FIGUEIREDO, H.; TAVARES, T. Biosorption of Cr(VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon - A comparative study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1-2, p. 799-809, 2008.

RADMER, R. J. Algal diversity and commercial algal products. **Bioscience**, v. 46, n. 4, p. 263–270, 1996.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, n. 2, p. 111-150, 1999.

SHALABY E. A. Algae as promising organisms for environment and health. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 9, p.1338-1350, 2011.

SHANAB, S. M. M; MOSTAFA, S. S. M; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidante and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608-613. 2012.

SILVA, T. G.; BOCK, G.; SANT'ANNA, C. L.; BAGATINI, I. L.; WODNIOK, S.; VIEIRA, A. A. H. 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**, v. 17, n. 1, p. 1-19, 2017.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; APPOLONI, A. M.; FERNANDES, J. B. K.; MILLAN, R. N. Feed of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, (Regan, 1910) in open pond: live and formulated diets. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 292-299, 2016.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BACHION, M. A.; BRAGA, F. M. S. Effects of food quality on growth and biochemical composition of a calanoid copepod, *Argyrodiaptomus furcatus*, and its importance as a natural food source for larvae of two tropical fishes. In: Lopes R.M., Reid J.W., Rocha C.E.F. (eds) Copepoda: Developments in Ecology, Biology and Systematics. **Developments in Hydrobiology**, v. 156, n.1, p. 393-401, 2001.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; FLORÊNCIO, T.; TRUZZI, B. S. Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 579-587, 2018 a.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; GALATTI-TEDESQUE, M.; MELO-SANTOS, G. L.; SCARDOELI-TRUZZI, B. Macrophytes to improve the cultivation of *Ankistrodesmus gracilis*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 9, p. 18-25, 2018 b.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu12 e de macrófita com npk. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 111 - 118, 2009.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; BERCHIELLI, F. A.; BRAGA, F. M. S. Use of alternative media and different types of recipients in laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PEREIRA, A. M. L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 875-883, 2008.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevino de peixes: I- Algas Clorofíceas. **Biotemas**, v. 6, n. 1, p. 93-106, 1993.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para a alimentação de organismos aquáticos**. Editora Rima, São Carlos, 2001.

SIPAÚBA-TAVARES, LÚCIA H.; FERNANDES, JOÃO B. K. ; MELO-SANTOS, GUSTAVO L. ; SCARDOELI-TRUZZI, BRUNO . Microalgae *Ankistrodesmus gracilis* as feed ingredient for ornamental fish *Xiphophorus maculatus*. **International Aquatic Research**, v. 1, p. 1-134, 2019.

SIRAKOV, I.; VELICHKOVA, K.; STOYANOVA, S.; STAYKOV, Y. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, n. 4, p. 81-84, 2015.

SIVA KIRAN, R.R.; MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V.; BINDIYA, P. Bioaccumulation of Cadmium in Blue Green Algae Spirulina (Arthrospira) indica. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.

STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J.; JÄGER, K. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 3, p. 215–221. 2002.

SUTHERLAND, D. L.; HOWARD-WILLIAMS, C.; TURNBULL, M. H.; BROADY, P. A.; CRAGGS, R.J. The effects of CO<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water Research*, v. 70, p. 9-26, 2015.

VAISHAMPAYAN, A.; SINHA, R. P.; HÄDER, D. P.; DEY, T.; GUPTA, A. K.; BHAN, U.; RAO, A. L. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **The Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

WANG, H. M. D.; CHEN, C. C.; HUYNH, P.; CHANG, J. S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Tecnologia Bioresource**, v. 184, p. 355-362, 2015.

ZHANG, Q.; LI, N.; LIU, X.; ZHAO, Z.; LI, Z.; XU, Z. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its “in vivo” antioxidant activity. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 1, p. 105-111, 2004.

## **CAPÍTULO 1:**

**Interferência da luminosidade na atividade dos antioxidantes em  
*Messastrum gracile* (Chlorophyceae)**

Artigo será submetido para a ALGAL RESEARCH, estando nas normas desta revista.

## Interferência da luminosidade na atividade dos antioxidantes em *Messastrum gracile* (Chlorophyceae)

### RESUMO

A luminosidade é um fator que pode alterar o metabolismo das microalgas, interferindo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequentemente, alterando a atividade dos antioxidantes. Este estudo avaliou e comparou o cultivo da microalga em condição não estressante ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a influência do estresse luminoso ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 24 horas e 72 horas em diferentes períodos de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) da microalga *Messastrum gracile* e sua resposta na atividade dos antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase, guaiacol peroxidase, glutathione peroxidase e carotenóides). Os resultados revelaram a maior atividade dos antioxidantes Catalase, Glutathione Peroxidase, Superóxido Dismutase e carotenóides no cultivo sem estresse luminoso, principalmente no 7º dia de crescimento, apresentando também um menor conteúdo de peroxidação lipídica e consequentemente menor estresse neste organismo. Os dados gerais também mostraram que o aumento da intensidade luminosa, por 24 ou 72 horas, reduz a atividade dos antioxidantes ao longo de todo o crescimento da *Messastrum gracile*. Este estudo mostra que *M. gracile* pode ser cultivada até o 7º dia da curva de crescimento, sem a necessidade de elevar a luminosidade durante seu cultivo para produzir melhores respostas antioxidantes.

Palavras-chave: Enzimas, microalga, cultivo, espécies reativas de oxigênio

## ABSTRACT

Light intensity is a factor which may promote changes in microalgae metabolism, which interfere in the production of reactive oxygen species (ROS) and therefore impacts the antioxidants activity. The present study evaluated and compared the growth of *Messastrum gracile* in non-stress light condition ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) with the influence of light stress ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) along 24 and 72 hours at different growth periods (7, 14, 21 and 28 days) and its response in antioxidant activity (superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, guaiacol peroxidase and carotenoids). The results revealed a higher activity for the antioxidants Catalase, Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase and carotenoids in the cultivation without light stress, specially at the seventh day of growth. The microalgi also displayed lower lipid peroxidation, which indicates low stress levels. The general data indicated that the light intensity increase, for 24 or 72 hours, decreases the antioxidant activity along the entire *M. gracile* growth. The present study shows that *M. gracile* can be cultivated until the 7<sup>th</sup> day of the growth curve, without the need to elevate light intensity along the cultivation to produce better antioxidant responses.

Keywords: enzymes, microalgae, cultivation, reactive oxygen species.

## 1. Introdução

As microalgas são importantes fontes de antioxidantes, devido a sua composição de vitaminas, pigmentos e enzimas. Seus carotenoides, importantes antioxidantes não enzimáticos, são utilizados na alimentação humana e animal, cosméticos (filtro solar e cremes antienvelhecimento), fármacos e corante de alimentos. Estudos mostram também o uso dos antioxidantes provenientes de microalgas no controle de doenças, como diabetes, obesidade e também seus efeitos quimiopreventivo do câncer, efeitos anti-mutagênicos, antitumorigênicos e antiinflamatório [1,2,3].

Os antioxidantes são capazes de reduzir os danos oxidativos ocasionados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante a respiração e fotossíntese, protegendo e otimizando as funções do organismo [4,5]. Eles podem ser enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), que é a primeira linha de defesa frente as ERO, dismutando  $2 O_2^{\bullet-}$ , gerando  $H_2O_2$  e  $O_2$  e a catalase (CAT EC 1.11.1.6) e a peroxidases, como por exemplo a guaiacol peroxidase (GPOX) e a glutathione peroxidase (GSH-Px EC 1.11.1.9) que fazem a quebra do peróxido produzido pela SOD e/ou por outros processos do metabolismo [6,7] e a glutathione redutase (GR EC 1.6.4.2). E também os antioxidantes não enzimáticos, dentre eles as vitaminas e carotenóides que são responsáveis por proteger o aparato fotossintético contra os danos oxidativos [8,9].

As microalgas contêm um grande potencial antioxidante natural, pois os organismos fotossintetizantes sofrem efeitos oxidativos deletérios durante o processo de fotossíntese em ambiente natural e também sofrem com as variações de luz e de oxigênio na coluna de água. Assim, esses organismos dependem de um sistema antioxidante efetivo e mais desenvolvido para responder ao estresse oxidativo gerado por esses fatores [10,5].

A luminosidade é um fator crucial para o crescimento e desenvolvimento de organismos fotoautotróficos, fornecendo energia para o processo de fotossíntese, em que ocorre a conversão de luz, CO<sub>2</sub>, água e nutrientes em oxigênio e na formação da biomassa constituída de vitaminas, proteínas e antioxidantes [11]. O aumento de luminosidade durante o crescimento da microalga é um fator capaz de alterar o desenvolvimento da mesma, podendo induzir a atividade enzimática, interferindo na síntese de proteína e no aumento da produção de carotenóides. Entretanto, o excesso de luminosidade pode acarretar a fotoinibição. Além disso, as microalgas passam por diferentes fases ao longo do cultivo, as quais afetam o metabolismo e composição físico-química [12].

A microalga *Messastrum gracile* (Chlorophyceae), anteriormente classificada como *Ankistrodesmus gracilis*, tem sido estudada visto que é de fácil cultivo, rápida taxa de crescimento e se adapta aos meios de cultura alternativos [13,14]. Até o presente momento, nenhum procedimento para a extração de antioxidantes desta espécie foi encontrado na literatura. Neste enfoque, o objetivo deste trabalho foi comparar o cultivo sem estresse e com estresse luminoso na atividade dos antioxidantes produzidos por *Messastrum gracile* durante seu crescimento, estabelecendo o melhor tempo de resposta.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Microalga e condições de cultivo

Foram realizadas três formas de cultivos para *Messastrum gracile* (CCMA- UFScar 5), sendo o primeiro em que a microalga foi cultivada em condição ideal de luminosidade de 60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (sem estresse) e dois experimentos em condição de estresse com luminosidade de 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , durante o período de 24 ou 72 horas. Todos os experimentos foram amostrados em diferentes dias de crescimento (7, 14, 21, 28 dias) de *Messastrum gracile*. A escolha da intensidade de luz (120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para o estresse da microalga foi determinada

em experimentos preliminares. A microalga *M. gracile* foi cultivada em meio de cultura CHU<sub>12</sub> no volume de 10 litros em triplicata para as três formas de cultivo.

## 2.2. Crescimento e Parâmetros do meio de cultura

Alíquotas de 1 mL em triplicata foram removidas das três amostras, nos dias de experimento (7, 14, 21 e 28 dias) e uma sub-amostra de 2x1 µL foi usada para quantificar a densidade celular por um hemocitômetro de Neubauer. A taxa de crescimento (k) foi calculada [15] e o comprimento total da *M. gracile* foi amostrado com microscópio Leica DFC 295 e objetiva de 40x micrométrico. O volume celular foi calculado pelo tamanho médio das células com o uso da forma geométrica mais apropriada, ou seja, dois cones acoplados [16]. O fósforo total (FT) e nitrogênio inorgânico total (NIT) foram quantificados a partir do meio de cultura das amostras, em espectrofotometria, de acordo com a metodologia proposta por [17, 18]. A clorofila-*a*, clorofila total e os carotenoides foram extraídos com acetona 80%, com leituras: clorofila-*a* em 663 nm e carotenoides (caroteno[c]+ xantofila[x]) em 470 nm. A clorofila total foi calculada com a somatória da clorofila *a* e *b* [19].

## 2.3. Análise do estresse oxidativo: Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A análise de malondialdeído (MDA) expressa o nível de estresse do organismo, pois demonstra a peroxidação lipídica através da detecção do composto aldeído. A concentração dos equivalentes de MDA foi calculada usando um coeficiente de extinção de  $1,55 \times 10^{-5} \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , com leituras entre 535 e 600 nm [20].

#### 2.4. Extração de enzimas e determinação de proteínas

Para a extração dos antioxidantes e posterior avaliação dos antioxidantes foi utilizada 5 gramas da biomassa úmida (pasta) da microalga *Messastrum gracile*. Esta forma de avaliação foi elaborada através de estudos preliminares. Para as análises de antioxidantes, foram testados diversos protocolos, sendo utilizada a metodologia de acordo com [21], em que a microalga foi centrifugada a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e adicionado 2,5 mL de solução tampão fosfato de potássio ao pellet de biomassa algal resultante da centrifugação. Esta pesagem foi escolhida especificamente para essa microalga. A utilização de um sonificador foi acrescentada a metodologia em função do aumento de proteína [22] nos testes preliminares de extração, sendo então sonicado (3 vezes por 20 segundos). Novamente o material foi centrifugado, seguindo o protocolo de [21] por 13.800 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante armazenado em freezer -80°C. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas totais, pelo método de [22].

#### 2.5. Análise da atividade de antioxidantes

A análise de Catalase foi realizada utilizando tampão fosfato de potássio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a atividade determinada pela decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além de 25 µL do extrato proteico dos dias 7, 14 e 21 e 50 µL do 28 [23]. Para a SOD foram utilizados 50 µl da amostra, tampão fosfato de sódio, metionina, NBT, EDTA e riboflavina totalizando 5 ml, havendo reação pelo composto blue formazana [24]. Para a GR utilizou-se tampão fosfato de potássio, 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid, NBT), glutathione oxidada, NADPH e 25 µL de extrato. A atividade da GR foi estimada pela redução da glutathione oxidada [25]. A GPOX foi determinada com a reação de tampão fosfato-citrato, guaiacol 0,5% e 50 µl do extrato vegetal

para os dias 7, 14, 21 e 30 µl para o 28º dia [26]. E a enzima GSH-px utilizou tampão fosfato de potássio, EDTA, GR, GSH, azida sódica, NADPH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [27].

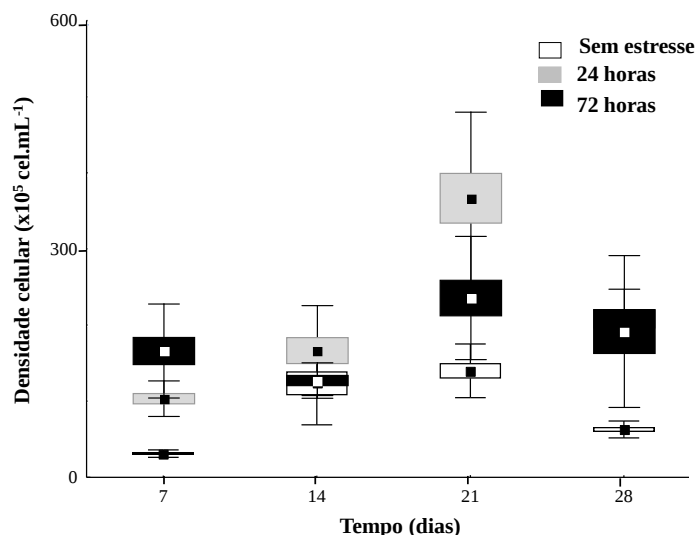
## 2.6. Análise estatística

Todos os dados foram realizados em triplicata. Foi aplicado aos dados a análise de variância (ANOVA) com o software SISVAR para verificação entre as médias do meio de cultura nos diferentes experimentos. Na ocorrência de diferenças entre os resultados foi aplicado o teste de Tukey e o nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Todos os resultados foram expressos com média e desvio padrão. Letras maiúsculas iguais na mesma linha significam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os três experimentos em cada dia de cultivo.

## 3. Resultados

### 3.1. Crescimento da microalga e variáveis do meio de cultura

A densidade celular máxima para as três condições de cultivo (sem estresse, 24 horas e 72 horas) foram obtidas no 21º dia da curva de crescimento com  $140 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ,  $301 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  e  $237 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ , respectivamente. A densidade celular média a longo da curva de crescimento da *Messastrum gracile* cultivada sem estresse teve uma variação de  $31 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  (7º dia) à  $140 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  (21º dia). Já para 24 horas de estresse luminoso variou de  $167 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  (7º dia) a  $301 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  (21º dia) e na condição de estresse de luz durante 72 horas a variação foi de  $104 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  (7º dia) a  $237 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  (21º dia) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Densidade celular do crescimento de *Messastrum gracile* em cultivo sem estresse e expostas ao estresse luminoso de 24 e 72 horas nos diferentes dias de cultivo (7, 14, 21 e 28). Letras maiúsculas iguais não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os três experimentos em cada dia de cultivo.

O fósforo total em cultivo sem estresse foi mais elevado do que o NIT apenas no 7º dia de crescimento, já no restante dos dias do crescimento da microalga, o NIT sobressaiu ao fosforo total. Para a intensidade luminosa elevado por 24 horas ao longo do período experimental foi quase de duas vezes mais elevado que o NIT, exceto no 21º dia em que a diferença ficou ao redor de  $140 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 1). No entanto, em estresse luminoso por 72 horas, os teores de FT foram menores do que o NIT nas primeiras duas semanas do crescimento de *Messastrum gracile* (7º e 14º dia), elevando-se a partir de 21 dias atingindo teores acima de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todos os teores de FT foram menores em estresse de 72 horas, já o NIT em 72 horas apresentou uma relação inversa com o FT (Tabela 1).

**Tabela 1**

Média e desvio padrão das variáveis do meio de cultura e condições biológicas de *Messastrum gracile* nas três condições de cultivo: sem estresse, estresse luminoso de 24 e 72 horas avaliadas em diferentes etapas da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias).

| Condições de cultivo | Meio de cultura          |                          | Microalga               |                        |      |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------|
|                      | NIT                      | FT                       | CT                      | VC                     | K    |
| Sem estresse         |                          |                          |                         |                        |      |
| 7                    | 1501,5±15 <sup>Aa</sup>  | 1.281,5±17 <sup>Ba</sup> | 14,3±2 <sup>Bb</sup>    | 26,8±14 <sup>ABb</sup> | 0,58 |
| 14                   | 643,3±24 <sup>Bb</sup>   | 1.600,2±30 <sup>Aa</sup> | 16,1±2 <sup>Aa</sup>    | 38,2±21 <sup>Aa</sup>  | 0,21 |
| 21                   | 1413,4±4 <sup>Aa</sup>   | 1.400,2±2 <sup>Aa</sup>  | 14,4±2 <sup>Bab</sup>   | 21,0±13 <sup>Bb</sup>  | 0,17 |
| 28                   | 279,9± 19 <sup>Cc</sup>  | 1.400,3±16 <sup>Ab</sup> | 14,3±2 <sup>Ba</sup>    | 35±8 <sup>Aa</sup>     | 0,11 |
| 24 horas             |                          |                          |                         |                        |      |
| 7                    | 461±5,6 <sup>Db</sup>    | 1.135±32 <sup>Ca</sup>   | 17±2,2 <sup>Aa</sup>    | 43,7±21 <sup>Aa</sup>  | 0,9  |
| 14                   | 737±14 <sup>Cb</sup>     | 1.179±20 <sup>Ca</sup>   | 13,7±1,4 <sup>Cc</sup>  | 19,1±10 <sup>Db</sup>  | 0,5  |
| 21                   | 1366±31 <sup>Aa</sup>    | 1.493±14 <sup>Ba</sup>   | 15±1,5 <sup>Ba</sup>    | 31,9±15 <sup>Ba</sup>  | 0,3  |
| 28                   | 968±10 <sup>Ba</sup>     | 2.273±30 <sup>Aa</sup>   | 14,9±1,8 <sup>Ba</sup>  | 15,9±15 <sup>Cb</sup>  | 0,2  |
| 72 horas             |                          |                          |                         |                        |      |
| 7                    | 1.348±47 <sup>Ba</sup>   | 871±11 <sup>Cb</sup>     | 14,6±2 <sup>ABb</sup>   | 34,2±20 <sup>Ab</sup>  | 0,9  |
| 14                   | 1.976±8,9 <sup>Aa</sup>  | 996±53 <sup>Cb</sup>     | 14,8±1,8 <sup>Ab</sup>  | 34,7±19 <sup>Aa</sup>  | 0,4  |
| 21                   | 1.080±11,6 <sup>Cb</sup> | 1.349±31 <sup>Ba</sup>   | 13,8±1,2 <sup>Bb</sup>  | 23,5±11 <sup>Bab</sup> | 0,3  |
| 28                   | 706±33 <sup>Db</sup>     | 2.122±44 <sup>Aa</sup>   | 14,5±1,7 <sup>ABa</sup> | 22,9±12 <sup>Bb</sup>  | 0,2  |

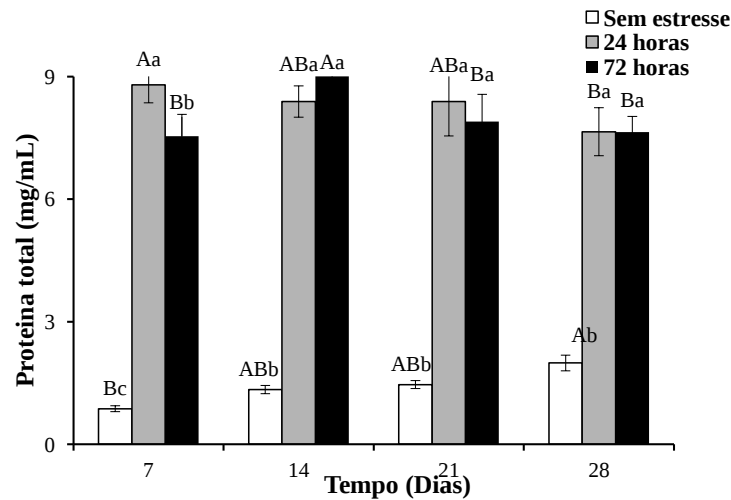
Tabela 1: NIT= nitrogênio total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); FT= Fósforo total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); CT= comprimento total ( $\mu\text{m}$ ); VC= Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ ); K= taxa de crescimento.

Nota: Letras iguais nas linhas significam que não ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A taxa de crescimento (k) de *M. gracile* foi mais baixa para o cultivo sem estresse em comparação com os dois períodos de estresse ao longo de todo o crescimento da microalga, sendo o 7º dia com a maior taxa de crescimento ( $k=0,58$ ). A taxa de crescimento foi similar nos dois períodos de estresse luminoso, sendo maior ( $k=0,9$ ) com 7 dias da curva de crescimento e menor ( $k=0,2$ ) no final do crescimento (28 dias) (Tabela 1).

A proteína total foi similar ao longo da curva de crescimento na condição sem estresse luminoso e de estresse luminoso por 24 horas. No entanto com 72 horas de estresse luminoso houve maior concentração de proteína total no 14º dia do crescimento. Comparando os estresses luminosos em cada dia de crescimento, houve menor teor de proteína total para a

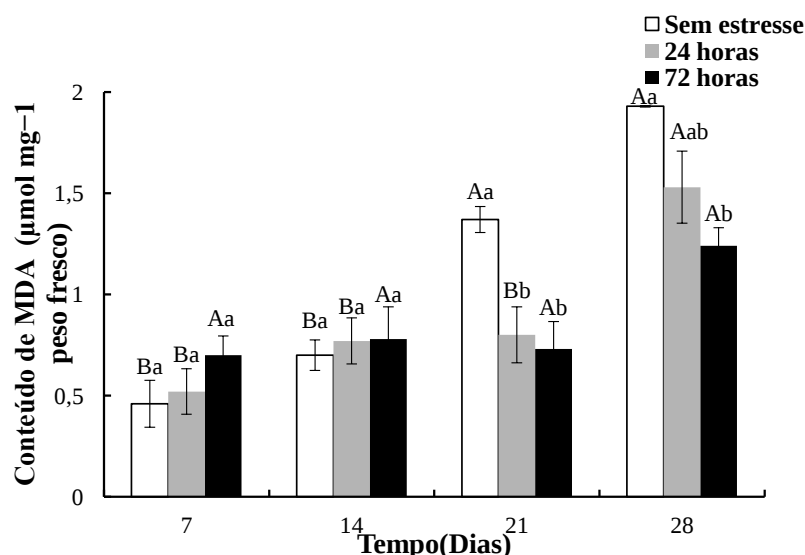
condição sem estresse luminosa em comparação com 24 horas e 72 horas de estresse de luz ao longo de todo o crescimento de *M. gracile* (Fig. 2).



**Fig. 2.** Proteína total durante o crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de *Messastrum gracile* em cultivo sem estresse e expostas ao estresse luminoso de 24 e 72 horas. Letras maiúsculas iguais não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os três experimentos em cada dia de cultivo.

### 3.2. Avaliação do estresse e antioxidantes da microalga

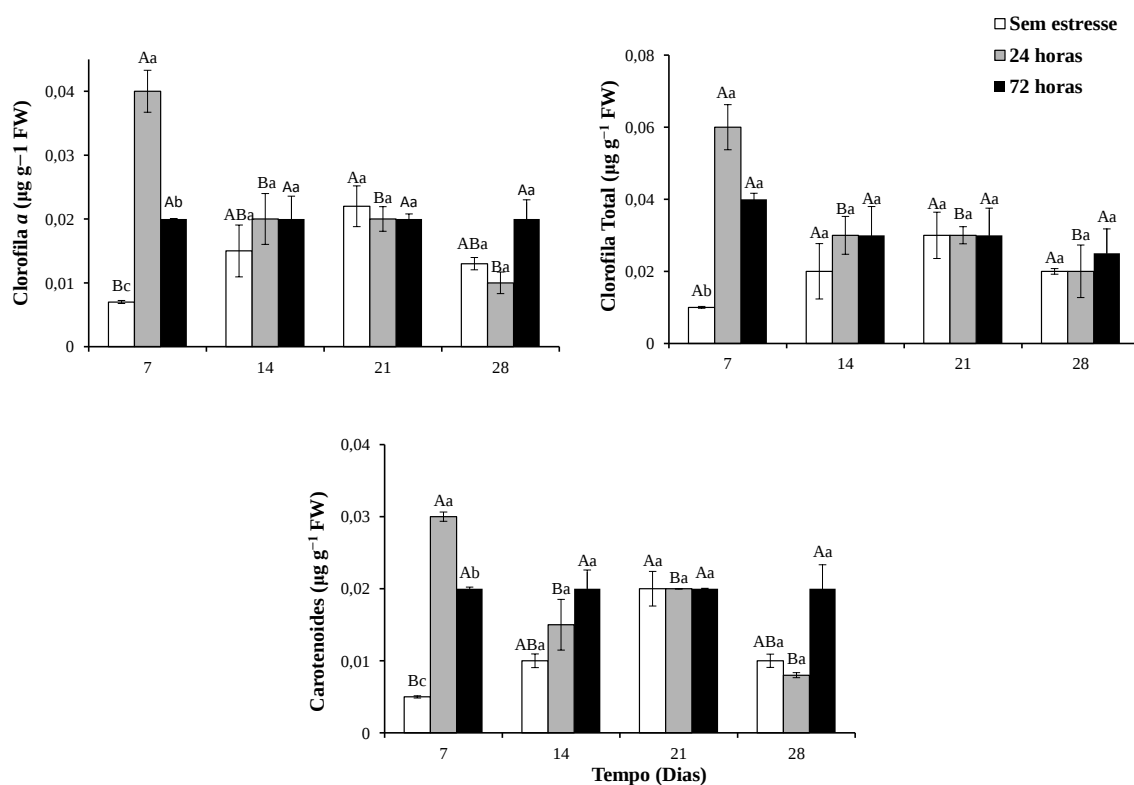
Foi constatado que o maior nível de estresse (MDA) foi obtido no 28º dia de crescimento para as três formas de cultivo, sendo o tratamento sem estresse com maior conteúdo de MDA em comparação ao cultivo de 24 horas e 72 horas de estresse luminoso. E a menor concentração ocorreu no 7º dia e 14º dia de crescimento da microalga para as três formas de cultivo (Fig. 3).



**Fig. 3.** Nível de estresse (MDA) em *Messastrum gracile* durante o período de crescimento (7, 14, 21, 28 dias) em cultivo sem estresse e expostas ao estresse luminoso de 24 e 72 horas. Letras maiúsculas iguais não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os três experimentos em cada dia de cultivo.

Os teores de carotenoides e clorofila *a*, foram mais elevados com 21 dias de crescimento para o tratamento sem estresse e clorofila total microalga *M. gracile* se manteve constante ao longo do crescimento.

Em condição de estresse luminoso por 24 horas, carotenoides, clorofila total e clorofila *a* foram mais elevados com 7 dias de crescimento e no estresse de luz durante 72 horas, não houve diferença significativa entre os dias de crescimento. Quando comparada as três intensidades luminosas em cada dia de crescimento, foi observada diferença no conteúdo de clorofila total, *a* e carotenoides apenas com 7 dias de crescimento, em que o estresse de 24 horas apresentou maior resultado estatístico (Fig. 4).

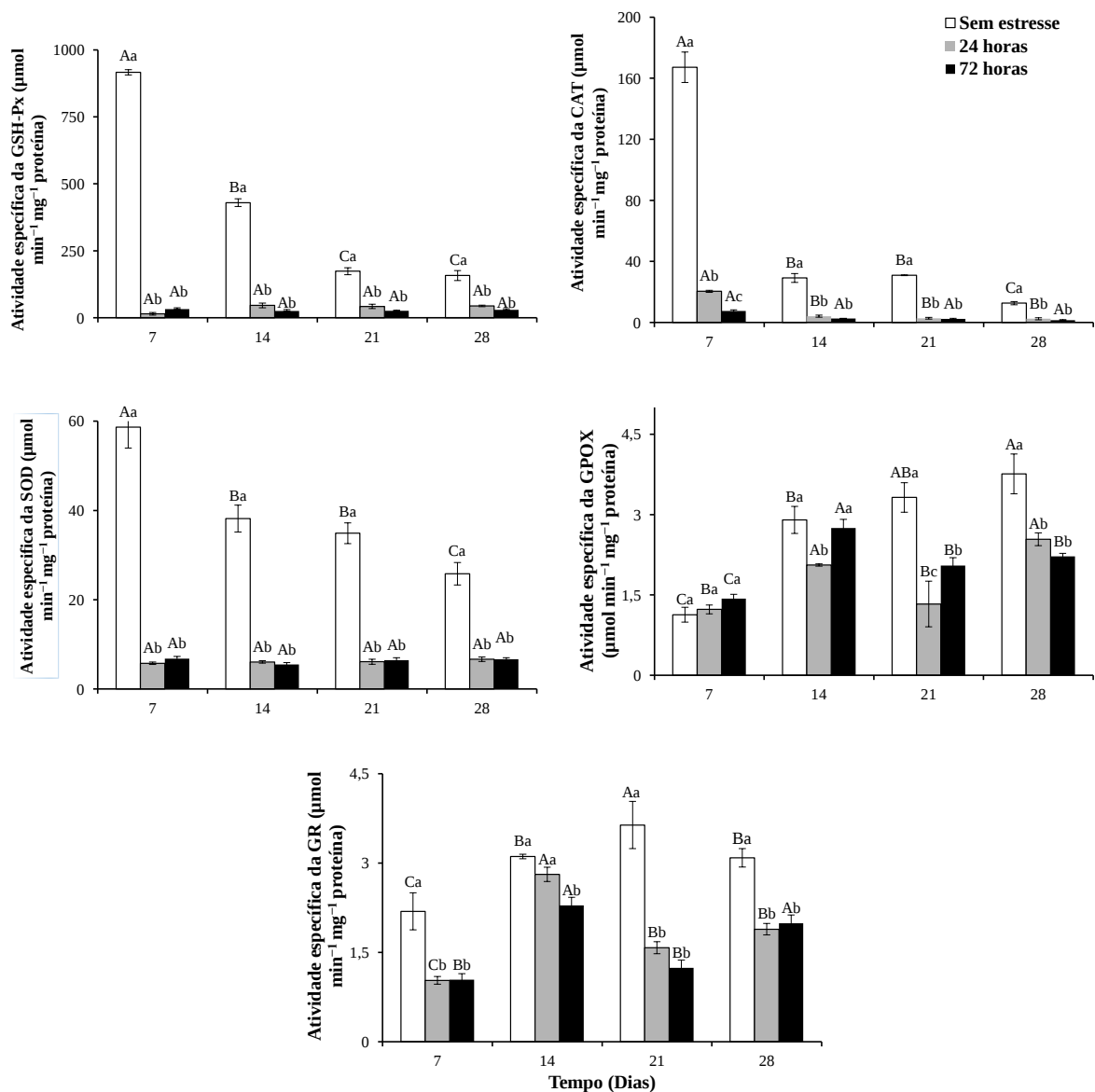


**Fig. 4.** Concentração de pigmentos (clorofila *a*, carotenoides e clorofila total) em *Messastrum gracile* nas três condições de cultivo: sem estresse, estresse luminoso de 24 e 72 horas. Letras maiúsculas iguais não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os três experimentos em cada dia de cultivo.

A GSH-px foi enzima que apresentou maior atividade, sendo mais elevada na condição sem estresse ao longo de todo o tratamento, sendo a maior atividade com 7 dias de crescimento. Para o estresse luminoso de 24 horas e 72 horas, não houve diferença significativa ao longo do crescimento da microalga (Fig. 5).

A enzima Catalase apresentou maior atividade na condição sem estresse em todo o crescimento em comparação com estresse luminoso de 24 horas e 72 horas. O 7º dia de crescimento foi o período que demonstrou maior atividade dessa enzima para a condição sem estresse e para o estresse luminoso de 24 horas. Já para o estresse luminoso de 72 horas não houve diferença significativa no crescimento de *M. gracile* (Fig. 5).

A SOD só apresentou diferença estatística no crescimento para a condição sem estresse, sendo a atividade mais elevada encontrada com 7 dias de crescimento. Quando comparada as três condições de cultivo, o tratamento sem estresse foi mais elevado em todos os dias de crescimento. A GPOX teve sua maior atividade com 21 e 28 dias de crescimento para a condição sem estresse, com 14 e 28 dias para o estresse luminoso de 24 horas e com 14 dias para o estresse luminoso de 72 horas (Fig. 5)



**Fig. 5.** Atividade específica dos antioxidantes durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28) de *Messastrum gracile* em cultivo sem estresse e expostas ao estresse luminoso de 24 e 72 horas. Letras maiúsculas iguais não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de

cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os três experimentos em cada dia de cultivo.

A menor atividade dos antioxidantes foi para a GR frente as três condições de cultivo ao longo do crescimento. A maior atividade da enzima para o tratamento sem estresse ocorreu com 21 dias de crescimento, para a condição de estresse luminoso de 24 horas a atividade mais elevada da GR foi encontrada com 14 dias de crescimento e para 72 horas de estresse luminoso a maior atividade ocorreu com 14 e 28 dias de crescimento. Quando comparados os três períodos de cultivo em cada dia da curva de crescimento de *M. gracile* houve maior atividade da enzima no cultivo sem estresse para todos os dias de crescimento (Fig. 5).

#### 4. Discussão e conclusões

Em relação ao meio de cultura, os resultados de nitrogênio total encontrados neste estudo foram inversamente proporcionais aos valores de carotenoides frente ao estresse luminoso por 24 horas e para o cultivo sem estresse, não havendo variação nos resultados de carotenoides com a mudança de nitrogênio com 72 horas de aumento de luminosidade.

Nossos resultados foram confirmados por [28], em que a menor oferta de nitrogênio, acarretou um aumento nos dados de pigmentos. Esses dados podem ser explicados, devido a microalga necessitar de nitrogênio para seu desenvolvimento e sua diminuição, aliado a intensidade luminosa, pode aumentar o estresse da microalga. A resposta de *M. gracile* é aumentar a produção de carotenoides para proteger a célula contra as espécies reativas produzidas em condição de estresse.

Em nossos dados, foi encontrado que, com 28 dias de cultivo, a microalga teve um menor valor de NIT e uma maior produção de FT. [13,29] cultivaram a *M. gracile* em intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  encontrando no 28º dia, dados de nitrogênio de  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$  e fósforo total de  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ . Comparando esses dados com os encontrados neste estudo, o

cultivo sem estresse obteve  $2,8 \text{ mgL}^{-1}$  de NIT e  $1,4 \text{ mgL}^{-1}$  de fósforo total, 24 horas (0,9 nitrogênio e  $2,2 \text{ mgL}^{-1}$  de fósforo total) e 72 horas (0,7 nitrogênio e  $2,1 \text{ mgL}^{-1}$  de fósforo total) foi possível observar a interferência da intensidade luminosa na nutrição de *M. gracile*, em que a mudança da condição ideal de luz faz com que a microalga tenha uma resposta nutricional menor.

As análises de clorofila *a*, clorofila total e carotenoides foram mais elevadas com 7 dias de crescimento da microalga em condição de estresse de 24 horas do que em 72 horas e para o cultivo sem estresse. Os carotenoides e a clorofila aumentaram simultaneamente, pois os carotenoides são responsáveis por preservar o aparato fotossintetizante e sob altas temperaturas exercem a função de proteger a integridade da membrana, aumentando sua fluidez e proporcionando a sobrevivência celular [9,30]. Esses dados diferenciam dos encontrados por [31] com estresse luminoso de 24 horas, houve decréscimo nestes compostos em relação a 84 horas de estresse. O autor sugere que a microalga conseguiu se recuperar quando exposta por maior tempo ao estresse, aumentando a produção destes compostos em função da aclimação às condições adversas.

Para todos os antioxidantes enzimáticos houve uma maior atividade quando a *M. gracile* foi cultivada sem estresse em comparação com os cultivos de estresse luminoso. A SOD, CAT e GSH-px apresentaram atividade mais elevada no 7º dia de crescimento, principalmente para o cultivo sem estresse. A SOD é a primeira linha de defesa frente as EROs, já que combate a primeira espécie reativa formada, a superóxido, que será quebrada em peróxido de hidrogênio e água. Com isso, seu funcionamento se inicia nos primeiros dias do crescimento da microalga e vai decrescendo com a diminuição da produção de superóxido ao longo do crescimento [6]. Assim que ocorre a formação do peróxido de hidrogênio, que também é uma espécie reativa, é necessário que outras enzimas façam a dismutação dessa ERO, assim a CAT, que está sendo produzida principalmente nos peroxissomos e a GSH-px

no citosol, iniciam sua atividade fazendo a quebra do peróxido de hidrogênio no 7º dia de crescimento e também diminuem sua atividade quando a maior parte do peróxido de hidrogênio disponível é degradado [32].

Estes dados também são refletidos nas informações de peroxidação lipídica encontradas na microalga *M. gracile*, em que a menor proporção, ou seja, o menor nível de estresse está estabelecido com 7 dias de crescimento. Estes resultados demonstram que os pigmentos, aliados com a SOD, CAT e GSH-px não só mantiveram os níveis de clorofila alto neste período, como também foram efetivos antioxidantes para essa espécie, sendo até capazes de minimizar os efeitos nocivos do estresse luminoso de 24 horas e 72 horas.

As enzimas GPOX e GR foram as enzimas que apresentaram as menores atividades, com melhores respostas no 28º dia de crescimento. Os últimos dias de crescimento da microalga é a fase em que está ocorrendo a morte celular e conseqüentemente ocorre naturalmente maior produção de espécies reativas, portanto maior estresse oxidativo. Devido a isso, neste período é necessário que o maquinário enzimático apresente uma atividade elevada para o combate das ERO, não sendo o ocorrido para essa espécie e, portanto, os níveis de MDA permaneceram altos nessa fase.

Esta espécie de microalga produz grandes quantidades de antioxidantes ao longo do seu crescimento, principalmente os carotenoides e as enzimas Catalase e GSH-Px, além da produção de antioxidantes ser maior no cultivo sem estresse luminoso em comparação com os cultivos com interferência luminosa. Apesar disso, os efeitos contra o estresse oxidativo no desenvolvimento da *M. gracile* são notados apenas no começo do crescimento, com 7 dias, com a ação dos carotenoides e das enzimas Catalase, SOD e GSH-Px. Com isso, pode-se concluir que não é necessário cultivar *M. gracile* até o final da sua curva de crescimento e aumentar a luminosidade em seu cultivo para induzir uma melhor resposta do sistema antioxidantes, já que a condição da microalga sem estresse ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) principalmente

no 7º dia de crescimento, apresentou uma maior atividade do conjunto antioxidante. Assim, esses resultados podem ser utilizados para futuras pesquisas, em que a microalga *M. gracile* pode ser aplicada para melhorar o sistema de defesa de outras espécies.

### **Contribuições dos autores**

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **Declaração de consentimento**

Não há conflitos, direitos humanos ou animais aplicáveis.

### **Declaration of authors' agreement**

O manuscrito foi aprovado por todos os autores.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a FAPESP pelo auxílio financeiro (14/24697-3) e a Capes (1768969) pela bolsa de mestrado para o primeiro autor.

## **5. Referências**

- [1] K.W. Chew, J.Y. Yap, P.L. Show, N. H. Suan, J.C. Juan, T.C. Ling, D. Lee; J. S., CHANG, Microalgae biorefinery: high value products perspectives, Bioresource Technology 229 (2017) 53-62.
- [2] S. Joshi, R. Kumari, V.N., Upasani, Applications of Algae in Cosmetics: An Overview, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology 7 (2018) 1269-1278.
- [3] A.H. Banskota, S. Sperker, R. Stefanova, P.J. McGinn, S.J. O'Leary, Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae, Journal of Applied Phycology 31 (2019) 309-318.

- [4] K. Taïbi, F. Taïbi, L. A. Abderrahim, A. Ennajah, M. Belkhodja, J.M. Mulet, Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L, *South African Journal of Botany* 105 (2016) 306-312.
- [5] C. Sansone, C. Brunet, Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production, *Antioxidants* 8 (2019) 199.
- [6] P. L. Grato, A. Polle, P.J. Lea, R.A. Azevedo, Making the life of heavy metal stressed plants a little easier, *Functional Plant Biology* 32 (2005) 481-494.
- [7] G. Noctor, C.H. Foyer, Intracellular Redox Compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling, *Plant Physiology* 171 (2016) 1581-1592.
- [8] A. K. Minhas, P. Hodgson, C.J. Barrow, A. Adholeya, A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids, *Frontiers in microbiology* 7 (2016) 546.
- [9] A. Gong, A. Bassi, Carotenoids from microalgae: A review of recent developments, *Biotechnology Advances* 34 (2016) 1396 – 1412.
- [10] M. I. Khan, J.H. Shin, J.D. Kim, The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products, *Microbial Cell Factories* 17 (2018) 36.
- [11] J.T.D. Fontoura, G.S. Rolim, M. Farenzena, M. Gutterres, Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp, *Process Safety and Environmental Protection* 111 (2017) 355-362.
- [12] O. Córdova, G. Ruiz-Filippi, F.G. Feroso, R. Chamy, Influence of growth kinetics of microalgal cultures on biogas production, *Renewable Energy* 122 (2018) 455-459.
- [13] L.H. Sipaúba-Tavares, L.C.C. Ibarra, T.B. Fioresi, Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) KORSIKOV (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK, *Boletim do Instituto de Pesca* 35 (2009) 111-118.
- [14] L.H. Sipaúba-Tavares, T. Florêncio, B. Scardoeli-Truzzi, Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov, *Brazilian Journal of Biology* 78 (2018) 579-587.
- [15] R.R.L. Guillard, Division rates. In: J. R. Stein (ed.), *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*, London: Cambridge University Press, (1973) 289-311.
- [16] H. Hillebrand, C.D. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollinger, T. Zohary, Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae, *Journal of Phycology* 35 (1999) 403-424.
- [17] H.L. Golterman, R.S. Clymo, M.A.M. Ohnstad, *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*, 2ed, Blackwell Scientific Publication 8 (1978) 213.
- [18] F. Koroleff, Determination of nutrients, In Grassnof, K. (ed.), *Methods of seawater analysis*, Verlag Cermie (1973) 7.

- [19] H.K. Lichtenthaler, Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology* 148 (1987) 350-382.
- [20] P.L. Gratão, C.C. Monteiro, R.F. Carvalho, T. Tezotto, F.A. Piotto, L.E.P. Peres, R.A. Azevedo, Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd stressful conditions, *Plant Physiology and Biochemistry* 56 (2012) 79-96.
- [21] H. Fan, H. Liu, Y. Dong, C. Chen, Z. Wang, J. Guo, S. Du, Growth inhibition and oxidative stress caused by four ionic liquids in *Scenedesmus obliquus*: Role of cations and anions, *Science of the Total Environment* 651 (2018) 570-579.
- [22] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-259.
- [23] R.A. Azevedo, R.M. Alas, R.J. Smith, P.J. Lea, Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley, *Physiologia Plantarum* 104 (1998) 280-292.
- [24] C.N. Giannopolitis, S.K. Ries, Superoxidedismutases: I. Occurrence in higher plants, *Plant Physiology* 59 (1977) 309-314.
- [25] R.A. Gomes-Junior, F.S. Delite, G.B. Pompeu, P.L. Gratão, P. Mazzafera, P.J. LEA, R.A. Azevedo, Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium, *Chemosphere* 65 (2006) 1330-1337.
- [26] H. Matsuno, I. Uritani, Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root, *Plant and Cell Physiology* 13 (1972) 1091-1101.
- [27] L. Flohé, W.A. Günzler, Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology* 105 (1984) 114-121.
- [28] H.H. Abd El-Baky, M.M. Hussein, G.S. El-Baroty, Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water, *African Journal of Biochemistry Research* 2 (2008) 151–164.
- [29] L.H. Sipaúba-Tavares, A.M.D.L. Segali, F.A. Berchielli-Morais, B. Scardoeli-Truzzi, Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte, *Acta Limnológica Brasiliensia* 29 (2017).
- [30] D. Camejo, A. Jiménez, J.J. Alarcón, W. Torres, J.M. Gómez, F. Sevilla, Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat shock treatment in tomato plants, *Functional Plant Biology* 33 (2006) 177-187.
- [31] B. Scholz, A. Rua, G. Liebezeit, Effects of UV radiation on five marine microphytobenthic Wadden sea diatoms isolated from the Solthorn tidal flat (Lower Saxony, southern North Sea)—part I: growth and antioxidative defence strategies, *European Journal of Phycology* 49 (2014) 97-114.
- [32] G. Noctor, C.H. Foyer, Intracellular Redox Compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling, *Plant Physiology* 171 (2016) 1581-1592.

# ANEXO

Uso da biomassa da microalga *Messastrum gracile* via pré-tratamento de sementes no crescimento da *Lactuca sativa*

## RESUMO

A biomassa de microalgas, utilizadas como pré-tratamento de sementes, pode representar uma alternativa sustentável para a melhoria e aumento da produção agrícola. A microalga *Messastrum gracile* foi cultivada em condição sem estresse luminoso ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e com estresse luminoso ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), e coletada durante 7, 14, 21 e 28 dias para a formação de quatro biomassas. O objetivo foi comparar o potencial de cada biomassa como pré-tratamento para a alface e suas influências na germinação e crescimento da cultura. As biomassas de cada dia de crescimento da microalga foram utilizadas como pré-tratamento para as sementes de alface, que ficaram emergidas por 4 horas e foram semeadas (50 sementes) em caixas gerbox, com 5 repetições para cada tratamento. Foram avaliados germinação, crescimento e nível de estresse em cada tratamento. O melhor tratamento aplicado foi a biomassa da microalga cultivada sem estresse luminoso, com 7 dias de crescimento de *M. gracile* para praticamente todas as análises, exceto massa seca, em que a biomassa da microalga com 21 dias de crescimento apresentou o melhor resultado.

Palavras-chave: Cultura, biofertilizante, semeadura, orgânico.

**ABSTRACT**

Microalgae biomass may presented a more sustainable alternative for increase in agriculture production when employed as seeds treatment. The microalgi *Messastrum gracile* was grown without light stress ( $60 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ ) and with light stress ( $120 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ ), and was collected along 7, 14, 21 and 28 days, which resulted in four distinct biomasses. The aim of the research was to compare the potential of each biomass as treatment for lettuce seeds and the influence in germination and culture growth. The biomasses for each microalgi growth day were employed as treatment for lettuce seeds, which were immersed for four hours and then were sowed (50 seeds) in gerbox-type containers, resulting in five repetitions per treatment. The germination, growth and stress levels were assessed. The better treatment was through the application of the microalgi biomass cultivated without luminous stress, at seven days of growth in all analyses, except for dry mass, in which the microalgi biomass at 21 days of growth presented the better result.

Keywords: Culture, biofertilizer, sowing, organic

## 1. Introdução

As microalgas são alvo de pesquisas devido à riqueza nutricional presente em sua biomassa, onde é encontrado nitrogênio, fósforo, vitaminas e antioxidantes, responsáveis no controle do crescimento e desenvolvimento das plantas e aumento da resistência a patógenos (ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK & KOCELA, 2019).

Além disso, por se tratar de um organismo fotossintetizante, as microalgas sofrem influência da luminosidade no seu crescimento e composição nutricional. O excesso de luz pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e modificar a atividade dos antioxidantes e interferir na nutrição da sua biomassa (SUTHERLAND et al., 2015; KRZEMIŃSKA et al., 2015).

Por esses fatores, produtos derivados de microalgas têm sido utilizados para alimentação, cosméticos, fármacos e para a melhoria do cultivo na agricultura. Atualmente, busca-se o aumento da produção de alimentos atrelado a melhoria de sua qualidade, além da preocupação com o meio ambiente e com os grandes custos de produção das lavouras. Desta forma, cresce o interesse em práticas de agricultura cada vez mais sustentáveis, tais como a orgânica, que além de proporcionar maior conservação ambiental, produz alimentos sem contaminação por metais pesados e com maior valor biológico. (GARCIA-GONZALEZ & SOMMERFELD, 2016).

Desta forma, o uso de microalgas na agricultura vem crescendo, como biofertilizantes, bioestimulante e no pré-tratamento de sementes, com o intuito de aumentar o desempenho produtivo das culturas agrícolas de forma sustentável (BOGHDADY et al., 2016).

A microalga *Messastrum gracile* pode ser um importante bioestimulante para a agricultura, já que é um organismo biológico com uma vasta gama de nutrientes e antioxidantes, tem um cultivo barato e uma rápida produção.

Os extratos de algas podem ser aplicados através do tratamento de sementes, da irrigação do solo, pulverização foliar ou em combinação de duas ou mais formas. Além disso, é necessário definir a cultura, o método de aplicação para ser utilizado quanto as frequências e épocas de aplicações de forma a influenciar no crescimento vegetal (DOURADO NETO et al., 2014; PEREIRA et a, 2018).

Sendo assim, a utilização de microalgas como biofertilizante ou bioestimulante na agricultura é uma solução, para evitar o uso excessivo de fertilizantes, herbicidas e pesticidas na produção agrícola e diminuir o impacto ambiental, além de melhorar a germinação de sementes, o desenvolvimento das mudas e elevar a tolerância a estresses (BOGHDADY et al., 2016).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça pertencente à família Asteraceae e considerada a hortaliça folhosa mais conhecida e de maior importância mundial (SILVEIRA 2016). É muito utilizada para a pesquisa devido ao seu ciclo de vida curto, tamanho pequeno, baixo custo de produção e uma grande adaptabilidade as condições de crescimento intensivo (PENNISI et al., 2019).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da biomassa da microalga *Messastrum gracile* cultivada sem estresse luminoso e com estresse luminoso, como pré-tratamento de sementes de alface e avaliar seus efeitos na germinação e desenvolvimento da cultura.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Cultivo e Biologia da *Messastrum gracile***

Foram realizadas duas formas de cultivo da microalga *Messastrum gracile* (CCMA-UFSscar 5) ao longo da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias). No primeiro tratamento a microalga foi mantida em condição ideal de luminosidade ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), durante todo o

experimento. No segundo tratamento, a microalga foi mantida em  $60 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  de luz e recebeu um estresse luminoso ( $120 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ ) durante 24 horas antes de ser coletada nos dias 7, 14, 21 e 28 dias da curva de crescimento. A microalga *M. gracile* foi cultivada em triplicata, em meio de cultura CHU<sub>12</sub> em volume de 10 litros, após o cultivo de 7, 14, 21 e 28 dias a biomassa algal foi centrifugada para a obtenção de uma pasta que foi utilizada nas análises de antioxidantes e na biomassa para o pré-tratamento das sementes de alface com o peso de 0,6 gramas para cada tratamento. O Nitrogênio total (NIT) e Fósforo total (FT) foram analisados no meio de cultura da microalga e seguiram a metodologia de Golterman et al. (1978) e Koroleff (1973).

## 2.2 Dados biológicos da *Messastrum gracile*

Densidade máxima (DM) (7, 14, 21 e 28 dias), taxa de crescimento (k) foi calculada por:  $k = (3,332 / t_2 - t_1 \times \log N_2 / N_1)$  (t = tempo; N = número de células (GUILLARD, 1973) e o tempo de duplicação (TD) foi calculado a partir dos resultados obtidos a partir da taxa de crescimento, por:  $Td = 1/k$  (Td = duplicação tempo,  $1/k = \text{dias por divisão}$ ) (GUILLARD, 1973).

## 2.3 Antioxidantes da *Messastrum gracile*

Para a extração dos antioxidantes foi utilizada a metodologia de Fan et al (2018) modificada e foram quantificados por espectrofotômetro, sendo a Catalase responsável pela quebra do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , realizada de acordo com Azevedo et al. (1998) e a enzima SOD que catalisa a superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, seguindo Giannopolitis e Ries (1977). Já a GR, catalisa a redução da glutatona em GSH (GOMES-JUNIOR et al. 2006), enquanto a GPOX seguiu Matsuno et al. (1972) e a quinta enzima analisada foi a GSH-Px, sendo determinada de acordo com Flohé et al. (1984) e os carotenoides foram analisados de acordo com Lichtenthaler (1987).

## **2.4 Tratamento na Alface (*Lactuca sativa*)**

Foram utilizadas sementes de alface crespa, por se tratar de uma cultura de rápido crescimento e fácil cultivo. A unidade experimental foi representada por 5 caixa gerbox por tratamento, sendo cada repetição com 50 sementes. A aplicação da biomassa de *M. gracile* foi realizada através do pré-tratamento das sementes, em que as mesmas ficaram emergidas por 4 horas em 0,6 gramas de biomassa da microalga, diluídas em 50 mg de água destilada. A escolha da concentração de microalga para a biomassa e o tempo do pré-tratamento foram determinados a partir de ensaios pré eliminares realizados em laboratório. As caixas gerbox, com sementes de alface, foram dispostas em germinador de ambiente controlado, com uma temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h/12 h.

## **2.5 Germinação e crescimento de plântulas**

Para germinação, a avaliação ocorreu a cada 12 horas após a aplicação dos tratamentos, durante uma semana. Os dados foram analisados segundo Maguire (1962) e Laboriau (1983), quanto à germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG). O crescimento foi analisado através da massa seca, em que 100 plântulas para cada tratamento foram colocadas por 72 horas a 70 °C em estufa. As medidas de massa seca foram realizadas utilizando-se uma balança analítica com precisão de 0,01 g. Para o desenvolvimento de plântulas (comprimento de raiz e altura de plântula) a avaliação ocorreu 7 dias após o início do experimento, sendo medidas 100 plântulas para cada tratamento.

## **2.6 Peroxidação lipídica das plântulas de alface (*Lactuca sativa*)**

A caracterização do estresse oxidativo na alface foi realizada através da quantificação do teor de substâncias reativas ao ácido (TBARS) como produto final do processo de peroxidação de lipídios, com leituras a 535 e 600 nm. O teor de MDA foi calculado conforme a equação específica para a reação (GRATÃO et al., 2012).

## 2.7 Análise estatística

Foi aplicado aos dados a análise de variância (ANOVA) com o software SISVAR para verificação entre as médias do meio de cultura da microalga e para os tratamentos na alface, nos diferentes experimentos, realizados em triplicatas. Quando ocorreu diferenças entre os resultados foi aplicado o teste de Tukey e o nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Os resultados foram expressos com média e desvio padrão. Letras maiúsculas iguais na mesma linha significam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias de cultivo (7, 14, 21, 28 dias) e letras minúsculas iguais entre os dois experimentos em cada dia de cultivo.

## 3. Resultados

### 3.1 *Messastrum gracile*

#### 3.1.1 Biologia e o meio de cultura

A maior absorção de nitrogênio total pela microalga *M. gracile* ocorreu com 28 dias para o cultivo sem estresse e 7 dias para o cultivo com estresse luminoso. Para o fósforo, a maior absorção ocorreu com 7 dias para as duas formas de cultivo. A densidade máxima ocorreu com 21 dias de crescimento para as duas formas de cultivo, sendo  $140 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> para a condição sem estresse e  $301 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> para a condição de estresse luminoso. A taxa específica de crescimento foi mais elevada com 7 dias de crescimento da microalga para o cultivo sem estresse luminoso e para o cultivo com estresse luminoso, a taxa específica foi de  $k = 0,58$  d  $k = 0,9$  respectivamente.

Tabela 1. Variáveis do meio de cultura e condições biológicas de *Messastrum gracile* nas duas condições de cultivo: sem estresse e estresse luminoso de 24 horas avaliadas em diferentes etapas da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias).

| Parâmetros                              | Sem estresse luminoso |                      |                     |                       | Com estresse luminoso |                      |                      |                      |
|-----------------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                         | Tempo (dias)          |                      |                     |                       |                       |                      |                      |                      |
|                                         | 7                     | 14                   | 21                  | 28                    | 7                     | 14                   | 21                   | 28                   |
| Meio de cultura                         |                       |                      |                     |                       |                       |                      |                      |                      |
| NIT (mgL <sup>-1</sup> )                | 1,5±15 <sup>Aa</sup>  | 0,6±24 <sup>Ba</sup> | 1,4±4 <sup>Aa</sup> | 0,3± 19 <sup>Cb</sup> | 0,5±5,6 <sup>Db</sup> | 0,7±14 <sup>Ca</sup> | 1,4±31 <sup>Aa</sup> | 1±10 <sup>Ba</sup>   |
| FT (mgL <sup>-1</sup> )                 | 1,3±17 <sup>Ba</sup>  | 1,6±30 <sup>Aa</sup> | 1,4±2 <sup>Aa</sup> | 1,4±16 <sup>Ab</sup>  | 1,1±32 <sup>Ca</sup>  | 1,1±20 <sup>Ca</sup> | 1,5±14 <sup>Ba</sup> | 2,3±30 <sup>Aa</sup> |
| Microalga                               |                       |                      |                     |                       |                       |                      |                      |                      |
| DM (x10 <sup>5</sup> mL <sup>-1</sup> ) | X                     | X                    | 140                 | X                     | X                     | X                    | 301                  | X                    |
| TD (dias)                               | 1,738986              | 2,391341             | 3,5612              | 6,04999               | 1,15527               | 2,21256              | 2,97613              | 4,35987              |
| K                                       | 0,58                  | 0,21                 | 0,17                | 0,11                  | 0,9                   | 0,5                  | 0,3                  | 0,2                  |

### 3.1.2 Antioxidantes

As enzimas GSH-Px, CAT e SOD tiveram atividade mais elevada no cultivo sem estresse luminoso, com 7 dias de crescimento da microalga e as enzimas GPOX e GR apresentaram maior atividade para o cultivo sem estresse com 28 dias de crescimento de *Messastrum gracile*. Para os carotenoides, houve uma maior produção com 21 dias de crescimento da microalga para o cultivo sem estresse luminoso e com 7 dias para o cultivo com estresse luminoso.

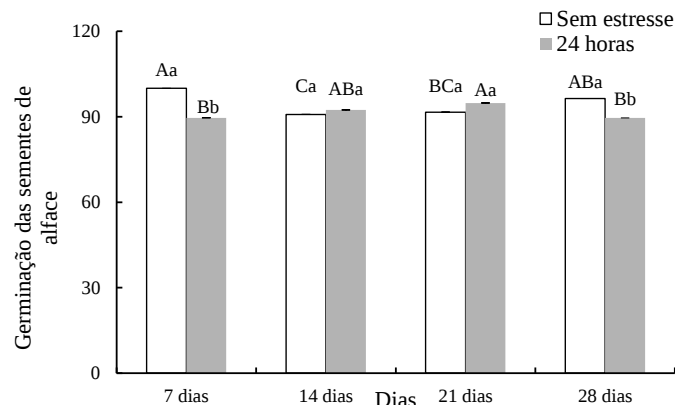
Tabela 2. Antioxidantes enzimáticos (GSH-Px, CAT, SOD, GPOX, GR em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) e não enzimático (Carotenoides em  $\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$ ) produzidos pela microalga *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e sem estresse durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias).

| Antioxidantes | Sem estresse luminoso     |                          |                          |                          | Com estresse luminoso    |                           |                           |                           |
|---------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|               | Tempo (dias)              |                          |                          |                          |                          |                           |                           |                           |
|               | 7                         | 14                       | 21                       | 28                       | 7                        | 14                        | 21                        | 28                        |
| GSH-Px        | 916±10 <sup>Aa</sup>      | 430±14 <sup>Ba</sup>     | 174±13 <sup>Ca</sup>     | 158±18 <sup>Ca</sup>     | 15±18 <sup>Ab</sup>      | 46±9 <sup>Ab</sup>        | 42±8 <sup>Ab</sup>        | 44±3 <sup>Ab</sup>        |
| CAT           | 168±10 <sup>Aa</sup>      | 29±3 <sup>Ba</sup>       | 31±0,3 <sup>Ba</sup>     | 13± 3 <sup>Ca</sup>      | 20±0,66 <sup>Ab</sup>    | 4±0,7 <sup>Bb</sup>       | 3±0,5 <sup>Bb</sup>       | 2±0,6 <sup>Bb</sup>       |
| SOD           | 59±5 <sup>Aa</sup>        | 38±3 <sup>Ba</sup>       | 35±2 <sup>Ba</sup>       | 26±3 <sup>Ca</sup>       | 6±0,3 <sup>Ab</sup>      | 6±0,3 <sup>Cb</sup>       | 6±0,6 <sup>Ab</sup>       | 7±0,5 <sup>Ab</sup>       |
| GPOX          | 1±0,1 <sup>Ca</sup>       | 3±0,3 <sup>Ba</sup>      | 3±0,3 <sup>ABa</sup>     | 4±0,4 <sup>Aa</sup>      | 1±0,1 <sup>Ba</sup>      | 2±0,02 <sup>Ab</sup>      | 1±0,4 <sup>Bb</sup>       | 2,5±0,1 <sup>Ab</sup>     |
| GR            | 2±0,3 <sup>Ca</sup>       | 3±0,04 <sup>Ba</sup>     | 4±0,4 <sup>Aa</sup>      | 3±0,2 <sup>Ba</sup>      | 1±0,1 <sup>Cb</sup>      | 3±0,1 <sup>Aa</sup>       | 2±0,1 <sup>Bb</sup>       | 2±0,1 <sup>Bb</sup>       |
| Carotenóides  | 0,01±0,0001 <sup>Bb</sup> | 0,01±0,001 <sup>Ba</sup> | 0,02±0,002 <sup>Aa</sup> | 0,01±0,001 <sup>Ba</sup> | 0,03±0,001 <sup>Aa</sup> | 0,01±0,003 <sup>BCa</sup> | 0,02±0,0001 <sup>Ba</sup> | 0,01±0,0003 <sup>Ca</sup> |

### 3.2 *Lactuca sativa*

A germinação das sementes de alface com a biomassa microalgal sem estresse apresentou melhores resultados no 7º dia de crescimento da *M. gracile*, em que houve germinação de todas as sementes. Já para a biomassa com estresse luminoso de 24 horas houve uma melhor germinação 21 dias de crescimento em relação ao restante dos dias. Quando comparado as duas biomassas, houve diferença significativa com 7 e 28 dias de crescimento da microalga, em que houve uma maior germinação das sementes de alface para a biomassa microalgal sem estresse luminoso em comparação com biomassa de estresse luminoso.

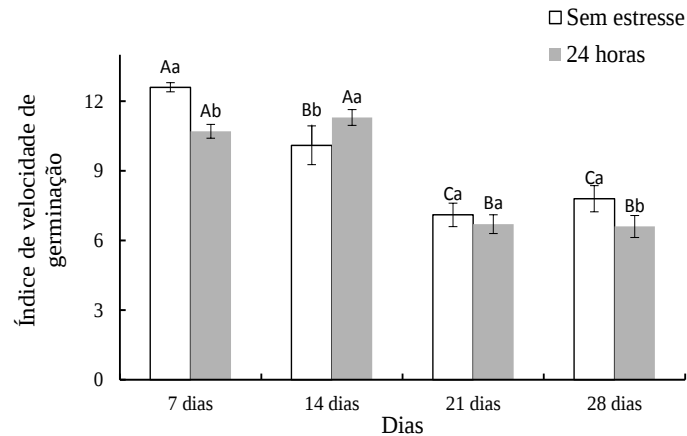
Fig. 1. Germinação das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e sem estresse.



O índice de velocidade de germinação (IVG) mais elevado para a biomassa sem estresse luminoso ocorreu com 7 dias da curva de crescimento em comparação com o restante do crescimento da microalga. Já para o cultivo de estresse luminoso, o IVG foi maior para os dias 7 e 14 da curva de crescimento.

Quando comparado as duas condições de cultivo, o tratamento sem estresse luminoso foi melhor em comparação ao tratamento com estresse luminoso com 7 e 28 dias e o contrário ocorreu com a biomassa de 14 dias de crescimento.

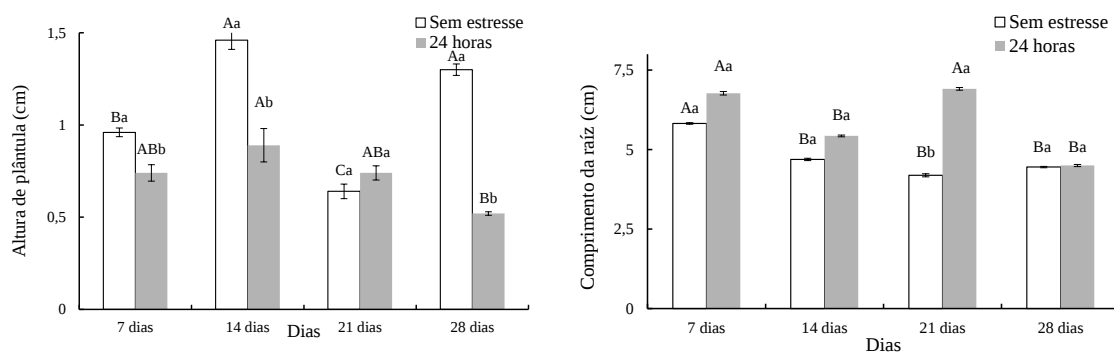
Fig. 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e em sem estresse.



A maior altura de plântula para a biomassa microalgal sem estresse luminoso ocorreu com 14 e 28 dias do crescimento da microalga e para a biomassa com estresse luminoso de 24 horas com 14 dias da curva crescimento de *M. gracile*. Quando comparado os dois tratamentos, houve diferença significativa com 7, 14 e 28 dias de crescimento, em que a biomassa sem estresse luminoso apresentou uma maior altura de plântula em comparação com o a biomassa com estresse luminoso.

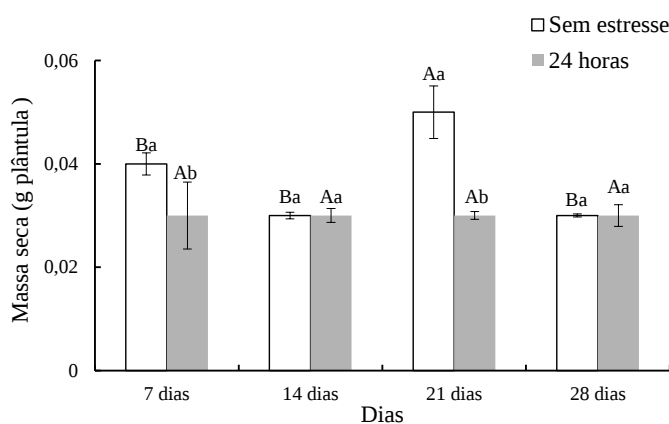
Para o comprimento de raiz, a biomassa sem estresse luminoso apresentou melhores resultados com 7 dias de cultivo da microalga e a biomassa com estresse luminoso de 24 horas obteve os maiores valores com 7 e 21 dias de crescimento da microalga *M. gracile*. Quando comparado as duas biomassas, houve diferença significativa apenas com 21 dias da curva de crescimento da microalga, em que a biomassa com estresse luminoso apresentou um maior comprimento de raiz em comparação com a biomassa microalgal sem estresse luminoso.

Fig. 3. Altura da plântula e comprimento da raiz de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e sem estresse luminoso.



A maior massa seca para a biomassa microalgal sem estresse luminoso foi com 21 dias de crescimento e para o tratamento com 24 horas de estresse luminoso não houve variação ao longo do crescimento de *M. gracile*. Quando comparado os dois tratamentos, só há diferença significativa com 21 dias de crescimento em que a biomassa sem estresse apresenta uma massa seca mais elevada em comparação com a biomassa com estresse luminoso.

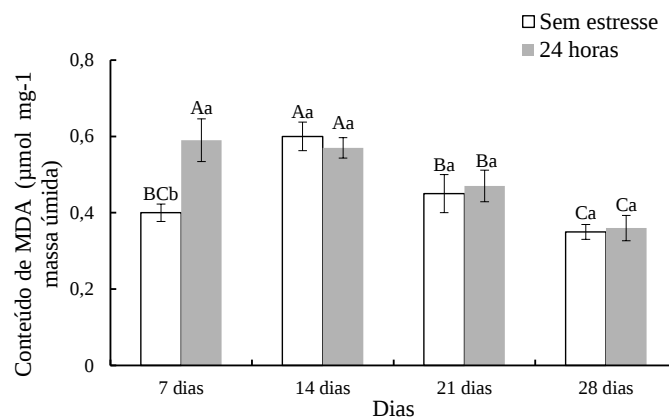
Fig. 4. Massa seca da plântula de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e sem estresse luminoso.



O maior conteúdo de MDA para a biomassa sem estresse luminoso ocorreu com 14 dias de crescimento da microalga. Para a biomassa com estresse luminoso, o conteúdo de MDA foi mais elevado com 7 e 14 dias de crescimento.

Na comparação entre as duas formas de biomassa microalgal ao longo do crescimento, só houve diferença significativa com 7 dias de crescimento, em que a biomassa sem estresse luminoso apresentou um menor conteúdo de MDA em comparação com a biomassa com estresse luminoso.

Fig. 5. Conteúdo de MDA das plântulas de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e em sem estresse luminoso.



#### 4. Discussão e conclusão

Em relação aos antioxidantes houve uma intensificação da atividade das enzimas antioxidantes quando *M. gracile* foi cultivada sem estresse em comparação com o cultivo de estresse luminoso, principalmente aos 7 dias de cultivo, em que as enzimas SOD, CAT e GSH-Px apresentaram uma atividade mais elevada. Essa maior atividade do sistema de defesa da microalga neste período foi efetiva na redução dos conteúdos de MDA na alface, em comparação com as sementes tratadas com a biomassa proveniente do estresse luminoso

O melhor desempenho do sistema de defesa antioxidante deste cultivo reflete também na germinação das sementes de alface em que a biomassa sem estresse luminoso, com 7 dias de crescimento da microalga, obteve 100% da germinação em todas as repetições. Também foi possível notar essa influência dos antioxidantes no IVG, que é mais elevado para a biomassa sem estresse luminoso com 7 dias de crescimento. O IVG elevado é extremamente

importante para a cultura da alface, já que as sementes de alface são altamente sensíveis as condições do ambiente e isso pode influenciar na emergência das plântulas. Com uma rápida germinação, as sementes sofrem menos danos do ambiente e garantem uma melhor produção (EIRA & MARCOS FILHO, 1990).

Com o sistema de defesa mais ativo, a germinação é finalizada de forma mais rápida e mais efetiva, e a plântula consegue transferir a energia para seu crescimento. Este fato pode ser notado no maior comprimento das raízes no tratamento com a biomassa sem estresse luminoso, com 7 dias de crescimento da microalga. As raízes mais compridas aumentam o campo de absorção de água e nutrientes, que são essenciais ao desenvolvimento de uma cultura e aumento da produção de biomassa da parte aérea (GIACOMINI et al., 2005).

Além disso, foi possível notar uma maior absorção de fósforo e nitrogênio pelas microalgas com 7 dias de crescimento, aumentando a parte nutricional da biomassa utilizada para o tratamento da germinação da alface. De acordo com Dias et al. (2017) as raízes têm um maior crescimento quando há grandes concentrações e disponibilidade de nutrientes, principalmente do fósforo, em que foi provado por Drew (1975), que o local com maior presença de P, teve um melhor desenvolvimento radicular.

Em relação a massa seca, o tratamento com a biomassa sem estresse luminoso apresentou maiores resultados para o período de 21 dias de crescimento. Este fato pode estar atrelado com o maior conteúdo de carotenóides produzidos pela microalga nesse período. Os carotenoides são responsáveis por proteger o aparato fotossintetizante e, consequentemente, aumentar absorção de luz (GONG & BASSI, 2016). A maior absorção de luz, eleva a produção de fotossíntese e gera um maior crescimento de plântula e com isso uma maior massa seca final.

Com isso é possível concluir que a biomassa de *Messastrum gracile* sem estresse luminoso e cultivada até o 7º dia de crescimento, quando utilizado como pré-tratamento pode

ser um importante artifício para cultura da alface, com a obtenção de alto IVG e redução no conteúdo de MDA para as sementes, assim como maior comprimento das raízes.

## 5 Referências

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes too transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigationn, in the leaves and roots of wild-tipe and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BOGHADY, M.; SELIM, D. A. H.; NASSAR, R. M.A.; SALAMA, A. M. Influence of foliar spray with seaweed extract on growth, yield and its quality, profile of protein pattern and anatomical structure of chickpea plant (*Cicer arietinum* L.). **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 207-221, 2016.
- DIAS, L. P. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; ARRUDAM B.; COSTA, M. M. Distribuição e morfologia do sistema radicular de *Eucalyptus dunnii* em resposta à aplicação de fósforo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 3, p. 203-213, 2017.
- DOURADO NETO, D. et al. Ação de bioestimulante no desempenho agrônômico de milho e feijão. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 371-379, 2014.
- DREW, M. C. Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. **New Phytologist**, v. 75, p. 479-490, 1975.
- EIRA, M. T. S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alface. I. Efeitos sobre a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 12, n. 1, p. 9-27, 1990.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology** v. 105, p. 114-121, 1984.
- GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051-1061, 2016.
- GIACOMINI, A. A.; DE MATTOS, W. T.; DE MATTOS, H. B.; WERNER, J. C.; CUNHA, E. A.; DE CARVALHO, D. D. Crescimento de raízes dos capins aruana e tanzânia submetidos a duas doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1109- 1120, 2005.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxidedismutases: I. Occurrence in higherplants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. 2ed. **Blackwell Scientific Publication**, v. 8, p. 213, 1978.
- GOMES-JUNIOR, R. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.
- GONG, A.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396 – 1412, 2016.
- GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 79-96, 2012.
- GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: J. R. Stein (ed.), Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements, London: **Cambridge University Press**, p. 289-311, 1973.
- KRZEMIŃSKA, I., PIASECKA, A., NOSALEWICZ, A., SIMIONATO, D., & WAWRZYKOWSKI, J. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of Chlorella protothecoides under different light intensities. **Bioresource technology**, v. 196, p. 72-77, 2015.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In Grassnof, K. (ed.). Methods of seawater analysis, **Verlag Cermie**, v. 7, 1973.
- LABORIAU, L. G. A germinação das sementes. Whashington, DC: OEA – Prog. Reg. Desenv. **Cientia.Tecnology**, p. 174, 1983.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. 34, p. 350-382, 1978.
- MAGUIRE, J. A. Speed of Germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.
- PENNISI, G.; ORSINI, F.; BLASIOLI, S.; CELLINI, A.; CREPALDI, A.; BRASCHI, I.; SPINELLI, F.; NICOLA, S.; FERNANDEZ, J. A.; STANGHELLINI, C.; GIANQUINTO, G.; MARCELIS, L. F. M. Resource use efficiency of indoor lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation as affected by red:blue ratio provided by LED lighting. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

PEREIRA, H. D.; FIORINI, I. V. A; VON PINHO, R. G.; RESENDE, E L.; PEREIRA, C. S. Ascophyllum nodosum seaweed extract effects in maize crop, **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 5, 2018.

SILVA E. M. N. C. P.; FERREIRA R. L. F.; ARAÚJO NETO S. E.; TAVELLA L. B.; SOLINO A. J. S., Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, 2011.

SILVEIRA, F.C. G; Desempenho de genótipos de alface-crespa em diferentes ambientes de cultivo, no município de Igarapava-sp; Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP; 2016.

SUTHERLAND, D. L; HOWARD-WILLIAMS, C.; TURNBULL, M. H.; BROADY, P. A.; CRAGGS, R.J. The effects of CO<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. **Water Research**, v. 70, p. 9-26, 2015.

ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK, M.; KOCELA, R. Organic and mineral soil improvers intended for the cultivation of butterhead lettuce. **Ekonomia I Środowisko**, v. 1, n. 68, 2019.