MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

WLADIMIR ANGELINO FAÉ NETO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE COMERCIAL EM NANNOCHLOROPSIS OCULATA: A IMPORTÂNCIA DO FERRO E DO ESTRESSE FISIOLÓGICO

ARRAIAL DO CABO / RJ
2018

WLADIMIR ANGELINO FAÉ NETO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE COMERCIAL EM NANNOCHLOROPSIS OCULATA: A IMPORTÂNCIA DO FERRO E DO ESTRESSE FISIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Gonzalez Rodriguez
Coorientadora: Prof. Dra. Silvana Vianna Rodrigues

ARRAIAL DO CABO / RJ
2018

MARINHA DO BRASIL

INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA - IEAPM

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE - UFF

PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA - PPGBM IEAPM/UFF

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 04

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Aos quinze dias do mês de junho do ano de dois mil e dezoito, às onze horas no auditório do Prédio Pesquisa, IEAPM, Arraial do Cabo, RJ realizou-se a prova de Defesa de dissertação, intitulada: "*Otimização da produção de substâncias de interesse comercial em Navanochloropsis Oculata; A importância do ferro e do estresse fisiológico*" de autoria do Candidato **Wladimir Angelino Faé Neto**, aluno do Programa em Biotecnologia Marinha, em nível de Mestrado. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores: Dra. Eliane Gonzalez Rodriguez, (IEAPM) – Orientadora - Presidente, Dra. Silvana Vianna Rodrigues, (UFF) - Membro Externo e Dra. Maria Helena Campos Baeta Neves, (IEAPM) - Membro Interno. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o candidato foi APROVADO pela Banca Examinadora. Foi concedido um prazo de 30 dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora, apresentar o trabalho em sua redação definitiva, atender ao requisito de publicação estabelecido nas normas do Programa e entregar a documentação necessária para elaboração do Diploma sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca e pelo Candidato.

Profa. Dra. Eliane Gonzalez Rodriguez – Presidente – IEAPM

Profa. Dra. Silvana Vianna Rodrigues UFF

Profa. Dra. Maria Helena Campos Baeta Neves – IEAPM

Assinatura do Candidato:

Rua Daniel Barreto s/n, Prédio Amazônia Azul.
Praia dos Anjos – Arraial do Cabo – RJ – CEP: 28.930-000
TEL.: (22) 2622-9020

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço, primeiramente, meus pais por todo apoio e suporte que sempre me deram para perseguir meus objetivos. Também aproveito e agradeço o apoio de toda a minha família.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Eliane Gonzalez, por todo seu apoio, auxílio e tempo dedicado a este trabalho. Obrigado pela oportunidade de aprendizado. A minha coorientadora, Dra. Silvana Vianna, por ter aberto as portas do laboratório para realização de importante parte desse trabalho e pela contribuição ao mesmo. Ao técnico do laboratório de cultivo de microalgas Luciano por toda ajuda durante as realizações dos experimentos, pelos ensinamentos passados e pela paciência. Aos técnicos do laboratório de química pelo auxílio com as análises de nutrientes. Ao Dr. Lohengrin Fernandes e a Dra. Maria Helena Baeta Neves por permitirem o uso de seus devidos laboratórios quando necessário. Ao Fred e a Layla pela ajuda com o uso do MINI-PAM. A Cássia Jonck e a equipe do laboratório de cromatografia do instituto de química da UFF por toda a ajuda, ensinamento e companheirismo na realização das análises de pigmentos no HPLC. Aos amigos de Niterói, em especial ao Luti e ao Jaca pela hospitalidade no Boa Viagem Brew Hostel por tantas semanas. Ao professor Renato Carreira e a doutoranda Laura Rozo do Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais da PUC-Rio pela grande ajuda com a análise dos ácidos graxos. Ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal Fluminense por todo o apoio prestado e ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado. Agradeço também a todos os professores e colegas da pós-graduação que contribuíram para minha formação.

Um agradecimento especial a todas as amizades feitas durante esse período em Arraial, a companhia de vocês tornou esse período mais leve e divertido. Obrigado por todas as festas, churrascos, almoços, conversas e quaisquer outras reuniões.

Agradeço à Clarissa Endo por todo apoio, companhia e revisões do trabalho. Obrigado a todos os amigos que me ajudaram e apoiaram de alguma forma.

E obrigado se você está lendo este trabalho.

RESUMO

Microalgas são organismos fotossintetizantes responsáveis por grande parte da absorção de dióxido de carbono (CO_2) e cerca de 40% da fotossíntese total do planeta. Além da produção de microalgas para a alimentação, tanto humana como para o cultivo de animais, e da produção de bicombustível, as microalgas e seus compostos são utilizados em cosméticos, nutracêuticos, remédios, na indústria alimentícia como conservantes e corantes. Existem espalhadas ao redor do mundo inúmeras empresas voltadas para a produção de microalgas e seus biocompostos.

Nannochloropsis oculata é uma espécie de grande interesse biotecnológico pelas diversas biomoléculas que ela produz. Entre as substâncias produzidas por esta microalga estão carotenoides como astaxantina, zeaxantina e betacaroteno que tem grande aplicabilidade no mercado. Além disso, essa espécie pode conter altas concentrações do ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) e mais recentemente estudos investigam suas características para ser usada como fonte de biodiesel por possuir um perfil de ácidos graxos adequado. Essa dissertação buscou otimizar a produção de pigmentos e ácidos graxos em *Nannochloropsis oculata* em meios de baixo custo, para isso foram realizados dois experimentos.

O primeiro experimento buscou alternativas entre proporções de nutrientes utilizando fertilizantes, onde foi acompanhado o crescimento (densidade celular e biomassa), nutrientes (nitrito, nitrato, amônia e fosfato), pH, temperatura, salinidade e concentração de pigmentos (analisadas por HPLC). A partir disso foi observado uma produção maior e com menor custo de carotenoides em um meio composto por 300 $mg.L^{-1}$ de sulfato de amônia, 7,5 $mg.L^{-1}$ de ureia e 25 $mg.L^{-1}$ de superfosfato de cálcio. Com base nesse resultado foi realizado um segundo experimento para avaliar a interferência do ferro no perfil de pigmentos e no perfil de ácidos graxos. Foram feitos seis tratamentos: A- Meio Conway, B-Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária, C- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de amônia, D-Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de amônia com adição de ferro na fase estacionária, E- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de amônia com adição de ferro no início do cultivo e F- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de amônia com adição de ferro no início e ao atingir a fase estacionária do cultivo. A concentração de ferro ($FeCl_3$) inicial nos meios E e F foi de 0,12$mmol.L^{-1}$. Os

parâmetros avaliados foram os mesmos do primeiro experimento com a adição da análise de ácidos graxos ao final do experimento e análise dos parâmetros Fv/Fm, ETRm, NPQ, alfa e Ek com fluorimetria PAM. A adição de ferro no início do experimento trouxe benefícios para a cultura, com maiores índices de Fv/Fm (~0,6), maior produtividade de clorofila-a (6mg.L^{-1}) e carotenoides totais (2mg.L^{-1}) com alta proporção de zeaxantina, betacaroteno e astaxantina. A adição de ferro na fase estacionária gerou aumento de zeaxantina no tratamento D, o qual foi relacionado com a queda de pH que ocorreu devido essa interferência. O perfil de ácidos graxos não apresentou diferenças entre os tratamentos com dominância de C16:0, C16:1 e C18:1.

Palavras-chave: Fluorimetria PAM, Zeaxantina, Ácido palmítico, Eustigmatofícea, Estresse nutricional.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms responsible for much of the absorption of carbon dioxide (CO2) and about 40% of the total photosynthesis of the planet. In addition, microalgae can be used for human and animal feeding, to produce biofuel; microalgae and their compounds are used in cosmetics, nutraceuticals, medicines, in the food industry as preservatives and dyes. There are numerous companies around the world focused on the production of microalgae and their biomolecules.

Nannochloropsis oculata is a specie of great biotechnological interest by the diverse biomolecules that it produces. Among the substances produced by this microalga are carotenoids such as astaxanthin, zeaxanthin and beta carotene that have great applicability in the market. In addition, this species may contain high concentrations of eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3) and more recently studies investigate its characteristics to be used as a source of biodiesel because it has an adequate fatty acid profile. This dissertation aim to optimize the production of pigments and fatty acids in *Nannochloropsis oculata* using low cost growth media, for which two experiments were carried out.

The first experiment looked for alternatives between nutrient proportions using fertilizers, which included measurements of growth (cell density and biomass), nutrients (nitrite, nitrate, ammonia and phosphate), pH, temperature, salinity and pigment concentration (analyzed by HPLC). It was observed a larger and cheapest production of carotenoids in a medium composed of 300 $mg.L^{-1}$ of ammonium sulfate, 7.5 $mg.L^{-1}$ of urea and 25 $mg.L^{-1}$ of superphosphate of calcium. Based on this result, a second experiment was performed to evaluate the interference of iron in the pigment profile and the fatty acid profile. Six treatments were used: A- Conway Medium, B- Medium Conway with addition of iron in the stationary phase, C- Fertilizer medium with 1.5 times the concentration of ammonia, D-Fertilizer medium with 1.5 times the concentration of ammonia with iron addition in the stationary phase, E-Fertilizer medium with 1.5 times the concentration of ammonia with addition of iron at the beginning of the culture and F- Fertilizer medium with 1.5 times the concentration of ammonia with addition of iron at the beginning of the culture and at the beginning of the stationary phase. The initial iron ($FeCl_3$) concentration in the E and F media was

0.12 mmol.L^{-1}. The parameters evaluated were the same as in the first experiment with addition of fatty acid analysis at the end of the experiment and analysis of the parameters Fv/Fm, ETRm, NPQ, alpha and Ek with a PAM Fluorometry. The addition of iron at the beginning of the experiment brought benefits to the culture, with higher Fv/Fm (~ 0.6), higher chlorophyll-a (6mg.L^{-1}) and total carotenoids (2mg.L^{-1}) with high proportion of zeaxanthin, beta carotene and astaxanthin. The addition of iron in the stationary phase generated increase of zeaxanthin in treatment D, which was related to the pH drop that occurred. The fatty acid profile showed no differences between treatments with dominance of C16:0, C16:1 and C18:1.

Keywords: PAM Fluorometry, Zeaxanthin, Palmitic acid, Eustigmatophycea, Nutrient stress

Lista de Ilustrações

Figura 1- Estrutura molecular de alguns carotenoides (adaptado de Gong e Bassi, 2016). 21

Figura 2- Temperatura (°C) média e desvio padrão para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento. 46

Figura 3- Salinindade (PSU) média e desvio padrão para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento. 47

Figura 4 – pH médio e desvio padrão para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento. 48

Figura 5- Evolução da concentração média de nutrientes (Fosfato, Amônia, Nitrito e Nitrato) para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento. 49

Figura 6- Densidade celular média e desvio padrão (céls.ml^{-1}) para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento. 52

Figura 7- Biomassa média e desvio padrão (g.L^{-1}) para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento. 53

Figura 8- Concentração média (µg.L^{-1}) de clorofila-a e carotenoides totais (a) e porcentagem média dos carotenoides violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car) (b), para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), nos dias 0, 4, 8 e 10. 54

Figura 9- Temperatura média e desvio padrão (°C) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio

fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) durante os 18 dias de experimento. 56

Figura 10 Média e desvio padrão dos valores de pH para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C (Meio fertilizante adaptado), D (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) durante os 18 dias de experimento. 57

Figura 11-Salinidade média e desvio padrão (PSU) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) durante os 18 dias de experimento. 58

Figura 12- Concentração média de nutrientes (Fosfato, Amônia, Nitrato e Nitrito) em $\mu mol.L^{-1}$ para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) nos dias 0, 14 e 18. 59

Figura 13- Densidade celular média e desvio padrão ($x10^7$ $Céls.mL^{-1}$) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária), para todo o período do experimento. 62

Figura 14- Biomassa média e desvio padrão ($g.L^{-1}$) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária), para todo o período do experimento. 63

Figura 15 Eficiência fotossintética potencial (Fv/Fm) média e desvio padrão para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no

início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária), para todo o período do experimento. 65

Figura 16- Média e desvio padrão para os parâmetros da curva de luz: alfa, ETRm, Ek e NPQ, para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 14 e 18. 66

Figura 17-Concentração média (ug.L^{-1}) de clorofila-a e carotenoides totais (a) e concentração média dos carotenoides: violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18. 68

Figura 18- Concentração média de pigmentos por célula em picogramas por célula (x10^{-3} pg.cel^{-1}) de clorofila-a e carotenoides totais (a) e concentração média dos carotenoides (b): violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18. 72

Lista de Tabelas

Tabela 1- Companhias que desenvolvem produtos com microalgas e suas informações complementares (adaptado de MAEDA et al. (2018)) 17

Tabela 2-Composição do meio Conway (CON)(WALNE, 1966) 37

Tabela 3-Composição meio fertilizante completo (MF) (YAMASHITA; MAGALHAES, 1984) 37

Tabela 4-Composição dos tratamentos do Experimento 2. 39

Tabela 5-Gradiente dos eluentes para análise no HPLC. 41

Tabela 6- Crescimento específico (μ(dia^{-1})) calculado para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), com média e desvio padrão. 52

Tabela 7-Custos calculados em reais para produção de um quilograma de biomassa de N. oculata (R$/Kg) e para produção de um grama de carotenoides totais (R$/g), levando em consideração apenas os valores do meio de cultivo. Para os tratamentos CON (meio Conway), MF (meio fertilizante), AX (meio fertilizante com o dobro de amônia), DF (meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR (meio fertilizante com o dobro de ureia). 55

Tabela 8 - Crescimento específico, média e desvio padrão, para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C (Meio fertilizante adaptado), D (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária). Calculado para do início ao fim do experimento (18 dias) e do início até a fase estacionária e máxima densidade média (14 dias). 62

Tabela 9- Concentração média e desvio padrão (μg.L^{-1}) de clorofila-a (chl-a) e dos carotenoides (car): violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18. 71

Tabela 10 - Concentração média e desvio padrão de pigmentos por célula em picogramas por célula (x10^{-3} pg.cel^{-1}) de clorofila-a(chl-a) e dos carotenoides: violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no

início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18. 75

Tabela 11 - Perfil dos ácidos graxos (% de ácidos graxos totais), concentração de ácidos graxos ($mg.g^{-1}$) e porcentagem do total de ácidos graxos saturados (SFA) somados ao total de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), e porcentagem do total de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C (Meio fertilizante adaptado), D (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) no último dia de experimento (dia 18). 76

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA – Análise de variância
ATP – Adenosina trifosfato
Asta – Astaxantina
Ant - Anteraxantina
B-car – Beta-caroteno
Canta – Cantaxantina
DHA – Ácido docosaexaenoico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
Ek – Irradiância de saturação
EPA – Ácido eicosapentaenoico
ETRm – Taxa de transporte de elétrons
FAME - Éster metílico de ácido graxo
FID – Detector de fotodiodo
Fv/Fm – Eficiência fotossintética potencial
GC – Cromatografia gasosa
HPLC – Cromatografia liquida de alta eficiência
IEAPM – Instituto de estudos do mar Almirante Paulo Moreira
LED – *Light Emitting Diode*
Lut - Luteína
MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados
NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
$N\text{-}NH_4$ – Nitrogênio amoniacal
$N\text{-}NO_2$ - Nitrogênio na forma de nitrito
$N\text{-}NO_3$ – Nitrogênio na forma de nitrato
NPQ – Dissipação não fotoquímica
PAM – Pulso de amplitude modulada
PAR – Luz fotossinteticamente ativa
PBR - Foto biorreator
$P\text{-}PO_4$ – Fosforo na forma de fosfato
PSII – Fotossistema dois
PSU – Unidade práticas de salinidade
PUFA – Ácidos graxos poliinsaturados
RLC – Curva rápida de luz
RPM – Rotações por minuto
SFA – Ácido graxos saturados
TAG - Triglicerídeos
Vau - Vaucheraxantina
Vio - Violaxantina
Zea - Zeaxantina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 MICROALGAS 16

1.1. LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS 18

1.2 PIGMENTOS 21

1.3 CULTIVOS 23

1.4 BIOREFINARIA 24

1.5 NANNOCHLOROPSIS OCULATA 25

1.6 FERRO 27

1.7 ESTRESSE FISIOLÓGICO 28

2 OBJETIVOS 34

2.1 OBJETIVO GERAL 34

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34

3 MATERIAIS E MÉTODOS 36

3.1 INÓCULO 36

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL 36

3.2.1 Experimento 1 – Proporção entre os nutrientes 36

3.2.2 Experimento 2 – A importância do ferro 37

3.3 DADOS ABIÓTICOS 38

3.4 BIOMASSA E DENSIDADE CELULAR 39

3.5 PIGMENTOS 40

3.6 ÁCIDOS GRAXOS 41

3.7 FLUORIMENTRIA PAM 43

3.8 ANÁLISE ECONÔMICA 43

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 44

4 RESULTADOS 46

4.1 EXPERIMENTO 1 46

4.1.1 Temperatura, salinidade e pH 46

4.1.2 Nutrientes 48

4.1.3 Biomassa e densidade celular 51

4.1.4 Perfil pigmentar 53

4.1.5 Análise Econômica 54

4.2 EXPERIMENTO 2 56

4.2.1 Temperatura, salinidade e pH 56

4.2.2 Nutrientes ... 58
4.2.3 Biomassa e densidade celular ... 61
4.2.4 Estresse fisiológico ... 64
4.2.5 Perfil pigmentar ... 67
4.2.6 Perfil de ácidos graxos ... 76
5 DISCUSSÃO ... 78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS ... 88
6.1 CONCLUSÕES ... 88
6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS ... 89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ... 90

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROALGAS

Microalgas são organismos fotossintetizantes responsáveis por grande parte da absorção de dióxido de carbono (CO_2) e cerca de 40% da fotossíntese total do planeta. Estima-se que existam de quarenta mil a dez milhões de espécies de microalgas as quais estão distribuídas em diversos grupos com características distintas. Tamanha diversidade de espécies reflete nas diferentes biomoléculas produzidas por esses organismos, tal como carotenoides, ficobilinas, ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), proteínas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis, entre outros compostos (SPOLAORE et al., 2006a; MARKOU; NERANTZIS, 2013). Esta vasta gama de moléculas permite o uso de diferentes microalgas como matéria prima para diversos produtos.

Inicialmente as microalgas, como a cianobactéria *Arthrospira platensis* (classe: Cianofícea), eram de interesse como fonte alternativa de proteína. Com o tempo e com o aumento da pesquisa outras propriedades começaram a ser exploradas e nos últimos anos o foco tem sido principalmente o uso de microalgas como fonte para a produção de bicombustíveis, pois as mesmas apresentam diversas vantagens em relação a outras fontes, tais como o crescimento mais acelerado, maior porcentagem de lipídios, o uso de áreas não agricultu ráveis, e no caso de espécies de microalgas marinhas, a economia de água doce. Além disso, a utilização das microalgas para o tratamento de efluentes se mostra viável pela alta remoção do excesso de nutrientes (Nitrogênio e Fósforo principalmente) e remoção de CO_2 do ambiente (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007; VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011).

Além da produção de microalgas para a alimentação, tanto humana como para o cultivo de animais, e da produção de bicombustível, as microalgas e seus compostos são utilizados em cosméticos, nutracêuticos, remédios e na indústria alimentícia como conservantes e corantes. Existem espalhadas ao redor do mundo inúmeras empresas voltadas para a produção de microalgas e seus biocompostos. Uma rápida estimativa feita através da plataforma digital LinkedIn em busca por empresas com o termo "*microalgae*" encontrou 165 empresas, que trabalham principalmente nos setores de energia, saúde e bem-estar, e biotecnologia. Algumas dessas empresas se encontram na tabela 1, assim como as principais espécies produzidas comercialmente e seus

produtos. As espécies ideais para cultivo devem ser de fácil cultivo e coleta da biomassa produzida, resistentes a mudanças ambientais e ter estratégias de engenharia genética acessíveis (CHISTI, 2007).

Tabela 1- Companhias que desenvolvem produtos com microalgas e suas informações complementares (adaptado de MAEDA et al. (2018))

Companhia	Microalga	Forma de Cultivo	Produtos principais	Local de produção	Área de Cultivo
TerraVia Holdings, Inc.	*Prototheca spp.* *Chlorella spp.*	Fermentação heterotrófica em biorreatores	Óleo alimentício Ômega-3 Óleo para cosméticos Biomassa de alga	Moema, São Paulo, Brasil	-
Sapphire Energy, Inc.	*Scenedesmus dimorphus* *Nannochloropsis spp.* *Arthrospira platensis*	Lagos abertos	Óleo cru	Luna County, Novo México, EUA	~55ha
Earthrise Nutritionals, LLC	*Arthrospira platensis*	Lagos abertos	Biomassa de alga	Calipatria, Califórnia, EUA	~33ha
Hainan-DIC Microalgae Co., Ltd.	*Arthrospira platensis*	Lagos abertos	Biomassa de alga	Haikou, Hainan, China	~15ha
Cellana, Inc.	*Nannochloropsis spp.*	Lagos abertos e fotobiorreatores	Alimento animal Biocombustível Ômega 3 Biomas de alga	Kailua-Kona, Hawaii, EUA	~0,7ha
Cyanotech Co.	*Arthrospira platensis* *Haematococcus pluvialis*	Lagos aberto	Biomassa de alga Astaxantina	Kailua-Kona, Hawai, EUA	~25ha

Continuação Tabela 1 - Companhias que desenvolvem produtos com microalgas e suas informações complementares (adaptado de MAEDA et al. (2018))

BASF	*Dunaliella salina*	Lagos abertos	Astaxantina Óleo para cosméticos Surfactante betaína	Hutt Lagoon, Austrália	~740ha
J-Power	*Fistulifera solair Mayamaea sp.*	Lagos aberts	Biocombustível	Kita-kyushu, Fukuoka, Japão	~0,2ha
Euglena Co., Ltd.	*Euglena gracillis*	Lagos abertos	Biomassa de alga Biocombustível	Ilha de Ishigaki, Okinawa, Japão	-
IHI Co.	*Boytrococcus braunii*	Lagos abertos	Biomassa de alga Biocombustível	Kagoshima, Japão	~0,15ha
ALGATechnologies	*Haematococcus pluvialis*	Fotobiorreatores	Astaxantina	Arava Desert, Israel	~6ha
Shenzhen Qianhai Xiaozao Technology Co., Ltd	*Nannochloropsis salina*	*Raceways*	Óleos Biomassa de alga Concentrado de alga	Shenzhen, Guangdong, China	-

1.1. LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos e lipídios nas microalgas estão relacionados com funções metabólicas, composição da membrana celular e armazenamento de energia. Predominantemente, ácidos graxos saturados (SFA) e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) compõem a fração de lipídios de reserva, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) compõem a fração de lipídios estruturais. Os triglicerídeos (TAG), são os lipídios de microalgas de maior interesse comercial, uma vez que são lipídios de reserva, compostos majoritariamente por ácidos graxos

saturados e monoinsaturados, utilizados pela indústria do bicombustível. Lipídios contendo TAG e ácidos graxos saturados e monoinsaturados são os compostos mais favoráveis à conversão em biodiesel por transesterificação (CHISTI, 2007). Atenção especial deve ser dada aos PUFA com quatro ou mais duplas ligações (C20:4n-6, C20:5n-3), que são suscetíveis a oxidação durante o armazenamento e reduzem a aceitação do biodiesel. O conteúdo de lipídios e o perfil de ácidos graxos mudam com as condições de cultivo e com a época do cultivo. De maneira geral condições de estresse costumam promover o acúmulo de lipídios de reserva, principalmente triglicerídeos (TAG), cuja composição é predominantemente de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Além disso, com aumento da densidade celular e biomassa, a partir da fase estacionária, ocorre a redução de ácidos graxos poli-insaturados. Essas mudanças tanto no perfil de ácidos graxos, como no acúmulo de lipídios estão relacionados ao desvio energético para a sobrevivência da célula (NASCIMENTO et al., 2013; WANG et al., 2013). A composição de ácidos graxos em microalgas varia de C14:0 a C20:0, sendo que as composições mais promissoras para a produção de biocombustível são as com alta proporção de ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (18:0) e ácido oleico (C18:1). Na prática é importante que a fonte para a produção de biodiesel tenha altas concentrações de C16:1 e C18:1, e que os outros ácidos graxos sejam o mais baixo possível, para que se tenha um combustível de qualidade. Entender a relação entre as variáveis ambientais e o perfil de ácido graxos é importante para favorecer o uso das microalgas para produção de biodiesel de qualidade (STANSELL; GRAY; SYM, 2012).

Já os setores da saúde, alimentação e de produção de rações estão mais interessados nos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, que são tipicamente encontrados nas membranas polares das microalgas, em especial ácido eicosapentaenoico (EPA), C20:5 n-3 e ácido docosaexaenoico (DHA), C22:6 n-3. Esses ácidos graxos possuem importante papel no desenvolvimento de crianças e melhoram a saúde de adultos (SPOLAORE et al., 2006a). O consumo de ômega-3 melhora a hemodinâmica vascular e cardíaca, as funções endoteliais, o controle autonômico, ajuda contra inflamações, controle do nível de triglicerídeos no sangue, trombose e arritmia. Tem efeitos moleculares relevantes, incluindo a estrutura da membrana e funções associadas, as propriedades dos canais de íons, regulação genética, síntese de eicosanoide e produção de mediadores contra inflamações

(MOZAFFARIAN; WU, 2011). Esses ácidos graxos trazem diversos benefícios à saúde, pois possuem propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antiúlceras, e geram um bem estar de maneira geral (SPOLAORE et al., 2006a). Lipídios incluídos na dieta de animais são fontes de energia metabólica e de metabólitos específicos para o crescimento. O mais importante nesse quesito é a presença de ácidos graxos poli-insaturados, sintetizados por microalgas, os ácidos graxos omega-3 são essenciais na dieta de muitos peixes e moluscos de importância comercial. Por serem essenciais para o desenvolvimento desses organismos o uso de espécies de microalgas com alto teor de PUFAs promove melhorias para a saúde do organismo, na aparência do produto e até mesmo na qualidade do produto (BROWN, 2002). Por isso muitos estudos procuram maximizar a produção desses ácidos graxos em microalgas utilizadas para alimentação desses organismos de interesse comercial (HODGSON et al., 1991). Normalmente a extração de ômega-3 é feita a partir de óleos de peixes, porém, as microalgas apresentam-se como fonte alternativa por ser uma opção vegana e de mais fácil absorção pelo sistema gastrointestinal.

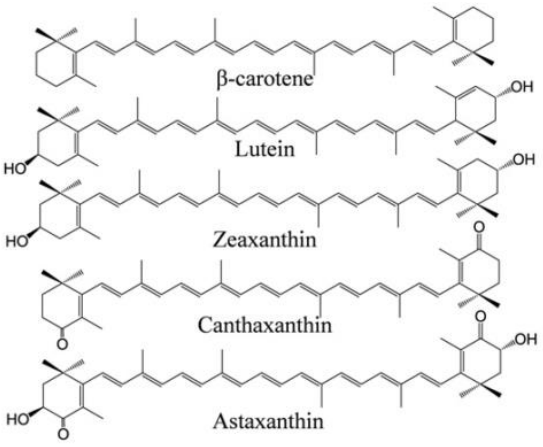
Apesar das muitas vantagens da utilização de microalgas como alimento existe um contraste com a ineficiência da produção em larga escala em relação ao custo. A produção de ácidos graxos de microalgas ainda é custosa quando comparada com as fontes de óleo de peixe e óleos de plantas, principalmente devido aos altos custos energéticos para bombeamento de água, transferência de CO_2, mistura do cultivo, nutrientes, coleta e secagem da biomassa (STEINRÜCKEN et al., 2017).

Diversos fatores podem influenciar o conteúdo de lipídios e a composição dos ácidos graxos. Em condições de estresse de nutrientes o total de lipídios pode aumentar com considerável aumento nos triglicerídeos e podem ocorrer mudanças na composição de ácidos graxos. Além disso, temperatura e luminosidade vão interferir na composição dos lipídios e no perfil de ácidos graxos. De maneira geral, o aumento de luz e de temperatura gera mais ácidos graxos saturados e aumento na formação de triglicerídeos. A depleção de nitrogênio aumenta as concentrações dos ácidos graxos C18:1 e C16:0 Muitas espécies de microalgas sob condições adequadas são capazes de acumular grandes concentrações de lipídios, e juntamente com outras características do seu crescimento constituem uma ótima fonte para a produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007; NASCIMENTO et al., 2013).

1.2 PIGMENTOS

Pigmentos são compostos químicos que absorvem e refletem determinados comprimentos de onda da luz na região correspondente ao visível para o olho humano. Eles integram o sistema fotossintético de microalgas onde absorvem energia luminosa. Os principais pigmentos se agrupam entre clorofilas, carotenoides e ficobilinas. As clorofilas estão presentes em todas as plantas superiores e algas fotossintetizantes, os carotenoides estão presentes na maior parte das algas, enquanto que as ficobilinas aparecem apenas em cianobactérias e algumas algas vermelhas. Nas algas e nas plantas superiores os carotenoides possuem diversas funções essenciais na fotossíntese, contribuem para a captação da luz, mantém a estrutura e funcionalidade dos complexos fotossintetizantes, eliminam espécies reativas de oxigênio, mitigam estados tripletos de clorofila e dissipam o excesso de energia. (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). A estrutura química dos mais de 600 carotenoides deriva de uma cadeia de polienos com 40 carbonos, que pode ser considerada a coluna da molécula. Este sistema é o que dá aos carotenoides a distinta estrutura molecular, as suas propriedades químicas e as características de absorção de luz. Essa cadeia pode terminar com grupos cíclicos (anéis) e pode ser complementada por grupos funcionais que contenham oxigênio. Os carotenoides de hidrocarbonetos são os carotenos, enquanto que os oxigenados são denominados xantofilas. Nas xantofilas o oxigênio pode estar como grupos -OH (como no caso da luteína), em grupos de oxigênio (como na cantaxantina), ou a combinação dos dois (como na astaxantina) (Fig. 1) (FRANK et al., 1994; GONG; BASSI, 2016).

Figura 1- Estrutura molecular de alguns carotenoides (adaptado de Gong e Bassi, 2016).



Pigmentos possuem alto valor agregado, e podem ser utilizados como aditivos em alimentos, como corantes e como suplementos alimentares (SPOLAORE et al., 2006a). Os efeitos dos carotenoides na saúde humana estão associados a propriedades antioxidantes. Beta-caroteno e as xantofilas astaxantina, cantaxantina e luteína são os carotenoides de principal interesse comercial. A produção de carotenoides provou ser a linha de maior sucesso em biotecnologia marinha, com alta demanda do mercado de produtos naturais. Alguns carotenoides de microalgas apresentam lugares importantes no mercado, como o beta-caroteno de *Dunaliella sp.* (classe: Clorofícea) como suplemento alimentar e precursor da vitamina A. Beta-caroteno é um pigmento em crescente demanda e com diversas aplicabilidades no mercado: como corante alimentar (principal uso), como provitamina A (retinol) em alimentos e rações animais, como aditivo em cosméticos e multivitamínicos e como produto natural antioxidante. Estudos sugerem que pessoas que mantém dietas ricas em betacaroteno de origem microalgal possuem menor incidência de câncer e doenças degenerativas (DEL CAMPO et al., 2000; KIM et al., 2008; BOROWITZKA, 2013; NOBRE et al., 2013).

Nas microalgas a astaxantina tem função de proteger a célula contra o excesso de radiação. Ademais, a astaxantina possui alto potencial biotecnológico, pois é um forte antioxidante com aplicações nutracêuticas, cosméticas, na indústria alimentícia e para alimentação de salmonídeos e camarões. Neste caso, a adição de astaxantina derivada de microalgas em formulas alimentares para salmonídeos incrementa a coloração da musculatura dos mesmos. Por isso a produção de astaxantina apresenta alto potencial biotecnológico e técnicas de cultura para a microalga dulcícola *Haematococcus pluvialis* (classe: Clorofícea) são bem desenvolvidas. De maneira geral existe uma tendência de microalgas acumularem astaxantina em condições de excesso de luz e depleção de nitrogênio (BOROWITZKA, 2013; PIGNOLET et al., 2013; SOLOVCHENKO, 2015).

A luteína é um dos carotenoides de maior importância para os seres humanos, juntamente com a zeaxantina, pois é essencial na pigmentação presente na retina (PULZ; GROSS, 2004; CHO et al., 2011). Além disso, a luteína tem papel de proteção contra doenças degenerativas como a degeneração macular e catarata. A luteína também é usada como corante alimentício e aditivos em rações (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). Luteína, zeaxantina e cantaxantina

também são utilizados na alimentação de frangos para melhor coloração da pele. Ficobiliproteínas, ficocianina e ficoeritrina são únicas às algas, diferente de outros pigmentos que ocorrem e vegetais terrestres, e já existem produtos alimentícios e cosméticos com base nesses pigmentos (PULZ; GROSS, 2004).

O uso de carotenoides na aquicultura e na agricultura se baseia nos efeitos positivos no crescimento e reprodução de espécies de interesse comercial. As xantofilas são de grande interesse por suas características antioxidantes, anticancerígenas e, também, ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares (BAI et al., 2011; DE JESUS RAPOSO; DE MORAIS; DE MORAIS, 2015). A concentração de pigmento contida na biomassa dependerá das condições de cultivo. Pigmentos secundários que se acumularão em condições de estresse, enquanto de maneira geral as clorofilas tendem a ser degradadas em condições de estresse. Os fatores mais significantes para o acúmulo de luteína em microalgas são a irradiância, pH, temperatura, disponibilidade e fonte de nitrogênio, salinidade e presença de substâncias oxidantes. As altas temperaturas estimulam o acúmulo de luteína, assim de outros carotenoides (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011).

1.3 CULTIVOS

Existem diversas possibilidades de formas de cultivo que variam de acordo com a finalidade do uso da biomassa produzida. Os cultivos podem ser em sistemas fechados ou abertos. Os sistemas fechados compreendem uma infinita gama de modelos de fotobiorreatores (PBR), que podem ter diversos formatos e diversas funcionalidades, mas de maneira geral eles envolvem controle dos parâmetros abióticos, injeção de CO_2, e em alguns casos o uso de luzes LED que procuram maximizar a produção de certas substâncias. Os fotobiorreatores em larga escala utilizam em grande parte luz natural e em poucos casos são usadas fontes artificiais de luz. Por isso a escolha do lugar para instalação é um fator importante. A produtividade dos PBR é maior, e o risco de contaminação por outras espécies indesejadas é menor, porém o custo associado a esse modelo é mais elevado. Os sistemas abertos compreendem lagos, sistemas *raceways*, o cultivo laminar e em cascatas. Esses sistemas podem ter diferentes formas de aeração, como borbulhamento de ar, as vezes enriquecido com CO_2, o uso de pás giratórias e no caso de o cultivo laminar e em cascata a aeração é gerada pelo próprio movimento da água.

A produtividade desses sistemas costuma ser menor, e o risco de contaminação também é maior, no entanto os custos de instalação e manutenção são menores. A possibilidade de controle dos fatores abióticos costuma ser menor, mas ainda é possível monitorá-los com diversos tipos de sensores (CHISTI, 2007; MOAZAMI et al., 2012; KANDILIAN; LEE; PILON, 2013; VADIVELOO et al., 2017).

O meio de cultivo deve prover todos os elementos inorgânicos para a constituição das células, os meios devem essencialmente conter nitrogênio, fósforo e ferro. Os nutrientes mais comumente adicionados são nitrogênio, fósforo, ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, silicato e níquel. Outros diversos nutrientes que importantes para o desenvolvimento das microalgas são encontrados em grandes quantidades na água do mar e por isso não precisam ser adicionados, salvo em casos específicos. Existem diversas composições de meios de cultivo propostos por diferentes autores de acordo com as espécies trabalhadas (CHISTI, 2007; CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2013; BARSANTI; GUALTIERI, 2014). Os custos associados ao meio de cultivo são muito altos para a produção em larga escala, próximo a US$3000 ton^{-1}, por isso é interessante a busca por outras fontes de nutriente como fertilizantes agrícolas, efluentes, águas residuais de aquicultura e concentrados de dessalinização como forma de tornar viável o cultivo em larga escala (RAWAT et al., 2013; LIU; BANGERT, 2014; MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017).

1.4 BIOREFINARIA

Os custos associados a todo o processamento da biomassa são altos, o que reflete no valor dos produtos quando chegam ao mercado, muitas vezes tornando inviáveis como é o caso do biodiesel. O biodiesel produzido a partir de microalgas ainda não é viável comercialmente principalmente pelo seu valor de produção ser muito elevado, ainda mais quando comparado ao seu concorrente que é o diesel oriundo do petróleo, o valor do biocombustível é ,atualmente, cerca de três vezes o valor do diesel comum. Por isso é de interesse da indústria buscar formas de reduzir os gastos com a produção. Além da melhoria das condições de cultivo e desenvolvimento de sistemas cada vez mais produtivos, seleção e melhoria de cepas, o uso de meios de cultivo de menor custo e melhoria nas formas de coleta da biomassa, o que alguns autores propõem é o uso do conceito de biorefinaria. A biorefinaria é a geração de múltiplos produtos a partir de uma mesma biomassa.

No caso das microalgas alguns estudos já demonstraram a viabilidade para a extração de lipídios, pigmentos e produção de energia simultaneamente. Para as biorefinarias serem eficientes em termos de custos é necessário a seleção de espécies e cepas que produzam altas concentrações de produtos de elevado valor agregado e com alta capacidade de adaptação ambiental. Além disso, é importante considerar a redução de perdas energéticas através do consumo da água e nutrientes (NOBRE et al., 2013; GOUVEIA, 2014; CHEN et al., 2017). Em muitos casos o cultivo de microalgas em condições de estresse gera acúmulo significativo de lipídios, carboidratos e de compostos com alto valor agregado. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar o possível acúmulo simultâneo de compostos para a produção de biodiesel e de produtos com alto valor agregado, como pigmentos, seguindo o conceito de biorefinaria (MARKOU; NERANTZIS, 2013).

1.5 NANNOCHLOROPSIS OCULATA

A espécie de microalga *Nannochloropsis oculata* é uma microalga unicelular da classe das Eustigmatofíceas. São células ovaladas com diâmetro entre 2-5 µm. Cada célula possuí um único cloroplasto, sem pirenoide. O reticulo endoplasmático do cloroplasto é continuo com o envelope nuclear. Dentro do cloroplasto se encontram lamelas que consistem de três tilacóides cada. Esta espécie é utilizada como alimento na aquicultura há muito tempo, principalmente para rotíferos, pequenos crustáceos e também para moluscos (SUKENIK; ZMORA; CARMELI, 1993). Apresenta bom crescimento quando cultivada em massa, podendo dobrar sua densidade até duas vezes ao dia (VOLKMAN et al., 1993; ANANDARAJAH et al., 2012). Pode crescer em diversas salinidades (GU et al., 2012), temperaturas e pH (SPOLAORE et al., 2006b), podendo ser cultivada até mesmo em efluentes (UGGETTI et al., 2014) e água de produção de petróleo (ARRIADA; ABREU, 2014).

As microalgas do gênero *Nannochloropsis*, são caracterizadas pela presença de clorofila-*a*, mas ausência de clorofilas-*b* e *c*; além disso possuem beta-caroteno e xantofilas: violaxantina, vaucheraxantina, cantaxantina, astaxantina, neoxantina, zeaxantina, anteraxantina e luteína (ANTIA; CHENG, 1982; VOLKMAN et al., 1993; LUBIÁN et al., 2000). Dentre as xantofilas os pigmentos encontrados em maiores concentrações são violaxantina e vaucheraxantina (LUBIÁN et al., 2000; REBOLLOSO-FUENTES et al., 2001). Em *Nannochloropsis sp*. grande parte dos

lipídios de reserva são do SFA ácido palmítico (C16:0) e do MUFA ácido palmitoleico (C16:1) encontrados mais frequentemente, no entanto em determinadas condições foi encontrado que 68% dos TAG de *N. oculata* consistem do PUFA ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) na fase estacionária quando comparado a 8% durante a fase exponencial. Também possui ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1).

A alta produtividade de lipídios, abundância de ácidos graxos poli-insaturados e crescimento robusto da *Nannochloropsis,* juntamente com a disponibilidade de sequências e ferramentas genômicas tornam esse gênero atrativo como plataforma celular para a produção de lipídios de interesse comercial (AL-HOQANI; YOUNG; PURTON, 2017). Alta concentração de EPA(C20:5) e vitamina C tornam *N. oculata* muito útil na alimentação de organismos marinhos na aquicultura (VOLKMAN et al., 1993). Mais recentemente vem sendo também muito pesquisada como uma potencial fonte de biocombustível por possuir até 70% do seu peso seco em lipídios. Inclusive, as microalgas do gênero *Nannochloropsis* são consideradas organismos modelos para a produção de biodiesel (LIU; SONG; QIU, 2017). A alta produtividade de EPA (C20:5) traz melhorias para a produção de ovos, peixes e gado, no entanto é um problema no uso das microalgas para biocombustível. Outros problemas são a quantidade de triglicerídeos com características adequadas e o link entre alta produtividade e alta produção de lipídios (AL-HOQANI; YOUNG; PURTON, 2017).

Esta espécie oleaginosa é considerada promissora para o cultivo em massa visando a produção de biocombustível (RODOLFI et al., 2009), devido à alta capacidade de produzir e armazenar triglicerídeos (TAG) em condições de depleção de nutrientes. Os TAG de *Nannochloropsis* consistem principalmente de ácidos graxos C16:0 saturados e monoinsaturados (SUKENIK; ZMORA; CARMELI, 1993), e portanto podem ser considerados boa fonte para biodiesel (PAL et al., 2011). *Nannochloropsis sp.* apresenta maiores índices de C20:4n-6 e C20:5n-3 do que outras clorofíceas e maiores quantidades de PUFAs de cadeia curta C16:2n-6, C16:3n-3, C18:2n-6 e C18:3n-3; sua alta atividade e síntese de C20:5n-3, pode torná-la melhor do que outras espécies, do ponto de vista da nutrição de animais marinhos (MOURENTE; LUBIÁN; ODRIOZOLA, 1990).

Apesar da concentração de pigmentos em *Nannochloropsis oculata* não ser tão alta como em outras espécies (BAI et al., 2011; PIGNOLET et al., 2013), a espécie cresce rapidamente e pode produzir uma vasta gama de pigmentos em pouco tempo (LUBIÁN et al., 2000; CHO et al., 2012). Diferentes estudos vêm procurando formas mais efetivas de melhorar a extração dos pigmentos das células (LIAU et al., 2010; CHO et al., 2011; SHEN et al., 2011; CRAMPON et al., 2013), mas pouco tem sido estudado em relação às melhoras nos cultivos para promover uma maior produção de pigmentos. Vale ressaltar que a extração de pigmentos como coproduto da produção de biocombustível a partir de microalgas pode elevar significativamente a rentabilidade dos cultivos de microalgas (BAI et al., 2011; NOBRE et al., 2013; PIGNOLET et al., 2013; GOUVEIA, 2014).

1.6 FERRO

O ferro é um dos principais metais traços para o desenvolvimento das microalgas, pois está presente em diversas funções metabólicas do fitoplâncton. Participando desde a transferência de elétrons até a síntese de clorofila (GEIDER; LA ROCHE, 1994), o ferro também é importante para a absorção de nitrato pela célula, pois está presente na composição da proteína ferrodoxina, a qual transfere elétrons para a nitrato redutase. A importância do ferro já foi estudada para regiões oceânicas caracterizadas por alta concentração de nutrientes (nitratos, fosfatos e silicatos) e baixa clorofila. Alguns autores, indicam que o ferro é o fator limitante nessas regiões e que a adição de ferro promove maior crescimento das microalgas (MARTIN et al., 1994; BOYD; LAW, 2001; BOYD et al., 2005).

Em cultivo de *Nannochloropsis sp.* com adição de Fe^{+2} houve aumento do crescimento e do acúmulo de beta-caroteno. Esse incremento nas concentrações de beta-caroteno surge como uma forma de proteção contra o estresse oxidativo (ENCARNACAO et al., 2012). A concentração de ferro no cultivo gera mudanças qualitativas e quantitativas no perfil pigmentar da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (classe: Bacilariofícea), sendo o perfil pigmentar um bom indicador fisiológico. Foi registrada a redução de beta-caroteno em células de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob depleção de ferro (KOSAKOWSKA et al., 2004). A baixa concentração de ferro em cultivos de *Phaeocystis sp.* (classe: Primnésiofícea) reduz

a concentração de pigmentos fotossintetizantes e consequentemente a biomassa (LEEUWE; STEFELS, 1998).

A adição de ferro no cultivo pode aumentar a produção de clorofila, a fotossíntese e acúmulo de lipídios, pois o ferro tem ação direta nas cadeias de transporte de elétrons nos cloroplastos e mitocôndrias, afetando o acúmulo de lipídios e o armazenamento de carbono, aumentando as concentrações de lipídios neutros em condições de estresse (WEI; HUANG, 2017). Além disso existem relatos de aumento no acúmulo de astaxantina em meios com maiores concentrações de ferro (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011). Alguns autores sugerem a adição de ferro aos meios de cultivo para *Dunaliella spp.* como forma de aumentar a biomassa e a concentração de beta-caroteno, principalmente em épocas de menor produtividade, como no inverno (MOJAAT et al., 2008; MENZYANOVA et al., 2009). Adetola (2011) diz que a adição de ferro nos cultivos gera mudanças no perfil de ácidos graxos de *Nannochloropsis salina* e *Chlorella vulgaris* (classe: Clorofícea*)*; para o cultivo de *N. salina* reduz a concentração de ácido oleico e aumenta a dos ácidos palmítico e linoleico. Dessa forma o ferro se mostra imprescindível na formulação de meios de cultivo de qualidade para a produção de biomoléculas de interesse comercial.

1.7 ESTRESSE FISIOLÓGICO

Para sobreviver às condições que limitam o crescimento, as microalgas acumulam produtos ricos em energia quando o fornecimento contínuo de carbono excede a capacidade fotossintética das células estressadas. O nível de irradiância afeta o balanço entre lipídios estruturais da membrana e lipídios de reserva gerando variação nas classes de lipídios e mudanças no perfil de ácidos graxos (SUKENIK; ZMORA; CARMELI, 1993). O aumento de ácidos graxos de cadeia curta está associado à formação de TAG (SUKENIK; ZMORA; CARMELI, 1993; SUKENIK et al., 1998). A qualidade da biomassa para aquicultura (altos índices de EPA) diminui com o envelhecimento da cultura, com o aumento da intensidade luminosa e com o aumento de salinidade e temperatura, com aumento concomitante das proporções de ácidos graxos saturados e monoinsaturados C14:0, C16:0 e C16:1 (RENAUD et al., 1991; SUKENIK; ZMORA; CARMELI, 1993)

Em microalgas, a principal forma de dissipação de energia para evitar os danos ao fotossistema II (PSII) devido à fotonoinibição é através do ciclo das xantofilas. A

de-epoxidação da violaxantina (vio) em zeaxantina (zea) leva a dissipação do excesso de energia no sistema antena do PSII, assim prevenindo dano e inativação do aparato fotossintético. A energia de excitação é dissipada como calor e pode ser registrada como dissipação não fotoquímica (NPQ) da fluorescência da clorofila-*a*. Em plantas vasculares e algas verdes, a dissipação termal aprimorada necessita da presença de um gradiente de prótons transtilacoidal e altas concentrações de zeaxantina (LI et al., 2000).

A produção de pigmentos pelas microalgas difere significativamente de acordo com as condições de produção e composição do meio de cultivo (LUBIÁN et al., 2000). O aumento da temperatura promove o aumento da concentração de beta-caroteno; com o aumento de temperatura também ocorre a transformação de violaxantina em anteraxantina e zeaxantina (LUBIÁN et al., 2000; HÄUBNER et al., 2014). Outro fator importante é o tempo de cultivo; ocorre o aumento de carotenoides com o tempo de cultivo principalmente depois de atingir a fase estacionária, e o aumento na densidade celular também favorece o acúmulo de carotenoides (ANTIA; CHENG, 1982; LUBIÁN et al., 2000). GU et al. (2012) demonstram que ao gerar estresse salino, aumentando a salinidade, ocorre a redução na concentração de carotenoides, enquanto que ao reduzir a salinidade a concentração de carotenoides aumenta. A depleção de nitrogênio resulta na redução da concentração de clorofila-*a*, mas as concentrações de carotenoides se mantém constantes (VAN VOOREN et al., 2012). A depleção de enxofre e fósforo resultam em aumento na concentração de carotenoides, especialmente de zeaxantina, devido a alterações no ciclo das xantofilas (FORJÁN et al., 2007). Uma baixa razão N/P resulta em aumento de biomassa e maior atividade antioxidante em *Nannochloropsis oculata* (ENCARNACAO et al., 2012).

O acúmulo de pigmentos secundários na parte externa do tilacóide é denominada carotenogênese secundária. A resposta carotenogênica é o aumento na produção desses pigmentos como forma de defesa ótica. Esses pigmentos apresentam alta estabilidade e não apresentam gastos energéticos altos para manutenção a longo prazo. É comum o acúmulo de carotenoides secundários em condições de baixa temperatura e alta luminosidade (SOLOVCHENKO; NEVEROV, 2017). A carotenogênese aumenta com a presença de espécies reativas de oxigênio, que são geradas por condições de estresse como alta intensidade luminosa, estresse salino ou altas temperaturas (GOUVEIA et al., 1996). Carotenoides primários, como a

luteína, tendem a ser degradados, enquanto que alguns carotenoides que agem como metabólitos secundários, beta-caroteno por exemplo, são acumulados em determinadas condições de estresse (MARKOU; NERANTZIS, 2013).

A depleção de nitrogênio leva à remobilização e redistribuição de nitrogênio celular, transformando proteínas não essenciais em proteínas essenciais. Ocorre o aumento de transcrições dos genes envolvidos na degradação de carboidratos e proteínas juntamente com a identificação de genes codificantes de plastídios e de transportadores da membrana mitocondrial, dessa forma ocorrem desvios nos carbonos fotossintéticos precursores do metabolismo de carboidratos e proteínas para a síntese de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos sob depleção de nitrogênio. O metabolismo mitocondrial tem papel importante na síntese de triglicerídeos, que converte proteínas e lipídios da membrana em precursores e fornece ATP e suas reduções equivalentes (e.g. NADH) para a produção de TAG (LI et al., 2014). A clorofila-*a* diminui em condições de depleção de nitrogênio, pois possui em sua composição grande quantidade desse elemento e então é degradada para que o nitrogênio seja utilizado em outras vias metabólicas da célula.

Dunalliela, sob depleção de nitrogênio e ferro, possui maior eficiência no uso de nutrientes, principalmente sob baixa luminosidade (YOUNG; BEARDALL, 2005). A depleção de nutrientes de maneira geral promove o aumento na porcentagem de lipídios nas células. Em *Dunalliela salina* e *Chaetoceros mulleri* (classe: Coscinodiscofícea) foram registrados valores de 56% e 46% de lipídios em condições com baixas concentrações de nutriente, além do aumento na concentração de éster metílico de ácido graxo (FAME) (GAO; YANG; WANG, 2013). No entanto, prolongada depleção de nitrogênio afeta a produção de ácidos nucléicos e proteínas afetando desta forma a biomassa (WEI et al., 2013).

Uma das maneiras utilizadas para avaliar estresse fisiológico em microalgas é através da fluorescência da clorofila-*a* e parâmetros calculados a partir da mesma (SUGGETT; BOROWITZKA; PRÁŠIL, 2011). A energia luminosa absorvida pela clorofila nos complexos antena das membranas dos tilacóides nos cloroplastos pode ser utilizada em reações fotoquímicas ou reemitida na forma de calor ou fluorescência. Essas vias competem pela energia luminosa absorvida, portanto a energia utilizada

para reações fotoquímicas é inversamente proporcional a fluorescência emitida pela clorofila-*a.*

O fluorímetro de pulso com amplitude modulada (PAM) mede diversos parâmetros que podem ser utilizados para identificar o estado fisiológico de organismos. Entre eles a taxa de transporte de elétrons (ETRm), dissipação não fotoquímica (NPQ), eficiência fotossintética (Fv/Fm) e luz de saturação (Ek). ETRm é a medida da taxa de transporte linear de elétrons através do PSII e está relacionado à performance fotossintética geral da microalga. (JUNEAU; GREEN; HARRISON, 2005). Microalgas, quando expostas a condições de supersaturação de luz, passam a exibir processos de dissipação de energia que diminuem a fluorescência da clorofila-*a*, denominados processos de dissipação não fotoquímicos (NPQ) (MASOJÍDEK et al., 2000). Altos valores de NPQ estão correlacionados com a conversão de carotenoides em pigmentos fotoprotetores quando expostos a estresse luminoso (BOUSSIBA, 2000). Os valores de Ek definem a luz de saturação mínima, que é obtido pelo ajuste da curva no modelo de PLATT; GALLEGOS; HARRISON (1980). Esse valor resulta da razão entre ETRm e a inclinação inicial da curva, denominada alfa (α). Ek tem relação com NPQ, com predominância de NPQ acima dos valores de saturação de Ek. A fotoinibição pode ser detectada por curvas de luz rápidas (RLC) que fornecem o limite de irradiância que a cultura pode tolerar e a partir de que intensidade de luz podem ocorrer foto-danos (SCHREIBER et al., 2002). A eficiência fotossintética potencial (Fv/Fm) é usada para estimar depleção de nutrientes. Microalgas em condições sem estresse apresentam valore de 0,6 a 0,7 (KROMKAMP; PEENE, 1999). Em condições de estresse fisiológico a razão Fv/Fm diminui, enquanto que o acúmulo de lipídios neutros aumenta. Em períodos de estresse fisiológico existe uma preferência no acúmulo de lipídios como reserva energética ao invés de carboidratos. A alta concentração de lipídios neutros torna a microalga mais interessante para o uso como fonte para a produção de biodiesel. O estresse fisiológico reduz a concentração de PUFA, presente em membranas de componentes de reserva, e aumenta os triglicerídeos (TAG), forma de armazenamento de energia (WEI; HUANG, 2017).

Os valores de NPQ devem ser interpretados com cautela, visto que o aumento de dissipação de energia térmica, pode ser causado pelo ciclo das xantofilas ou por lentos danos ao aparato fotossintético. Quando microalgas são cultivadas em

depleção de nitrogênio a eficiência do PSII diminui, por consequência da redução na quantidade de pigmentos fotossintetizantes (MASOJÍDEK et al., 2000). Estresse nutricional em microalgas é geralmente detectado pela queda no eficiência fotossintética (Fv/Fm) (WHITE; ANANDRAJ; BUX, 2011), essa queda é acompanhada por uma redução no valor de alfa.

O uso do fluorímetro PAM para acompanhar o estado fisiológico de cultura e o uso dos parâmetros medidos pode prover informações sobre formas de melhorar a produção de substâncias de interesse comercial, como pigmentos e alguns ácidos graxos. Devido à grande importância fisiológica do ferro é essencial a utilização deste micronutriente na composição de meios de baixo custo, pois este pode melhorar a produtividade do cultivo mantendo custo. A relação entre estresse fisiológico, produção de pigmentos e ácidos graxos, e o uso de meios de baixo custo ainda é pouco relatada na literatura. Após quase 70 anos de pesquisa em torno do uso de microalgas para soluções biotecnológicas, ainda há pontos importantes a serem pesquisados para atingir produção de microalgas em escala comercial com preços competitivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aperfeiçoar um meio de baixo custo com fertilizantes para a produção de pigmentos e ácidos graxos de interesse comercial a partir da microalga *Nannochloropsis oculata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se há modificações no perfil de pigmentos em *N. oculata* cultivada em meio fertilizante com diferentes proporções entre os nutrientes.

Verificar se há modificações no perfil de pigmentos e de ácidos graxos em *N. oculata* cultivada em meio fertilizante com ferro em relação ao meio fertilizante sem adição de ferro e ao meio controle Conway.

Verificar a importância do ferro no estresse fisiológico das células e relacioná-lo com os perfis de ácidos graxo e de pigmentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INÓCULO

Para a realização dos experimentos foi utilizado um inoculo de *Nannochloropsis oculata* do banco de cepas do Laboratório de Cultivo de Microalgas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). Antes dos experimentos o inoculo foi aclimatado por duas semanas nas condições de temperatura, salinidade e luz iniciais do experimento. Durante esse período a densidade celular foi monitorada diariamente.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

3.2.1 Experimento 1 – Proporção entre os nutrientes

O experimento 1 analisou as proporções entre os nutrientes do meio fertilizante e a relação com a produção de pigmentos foi realizado em erlenmeyers de três litros, com dois litros de cultura. Foram realizados cinco tratamentos com três réplicas cada. Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

i) Meio Conway, como controle (WALNE, 1966) (CON) (Tabela 2).
ii) Meio com fertilizantes (YAMASHITA; MAGALHAES, 1984)(Tabela 3) (MF).
iii) Meio com fertilizantes com o dobro da concentração de íon amônio (AX).
iv) Meio com fertilizantes com o dobro da concentração de ureia (UR).
v) Meio com fertilizantes com o dobro da concentração de fósforo (DF).

O inóculo de *Nannochloropsis oculata* do cepário do laboratório de microalgas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira foi cultivado em meio Conway até atingir 8 litros, os quais foram usados para dar início ao experimento. O experimento teve início com 1,5 litros de meio de cultivo e 500 mL do inóculo. Dessa forma a densidade celular inicial foi de $1x10^7$ céls.mL^{-1}. O cultivo foi realizado em uma sala com temperatura controlada de 25±2 °C, com luz constante de 210 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, salinidade inicial de 30 e aeração moderada e constante. A cada dois dias foram retiradas alíquotas de 200mL para realizar as análises desejadas.

Tabela 2-Composição do meio Conway (CON)(WALNE, 1966)

Nutrientes	**Concentração final (mg.L^{-1} água do mar)**
$FeCl_3.6H2O$	1,3
$MnCl_2.4H2O$	0,36
H_3BO_3	33,6
EDTA	45
$NaH_2PO_4.2H_2O$	20
$NaNO_3$	100
B12	0,000005
B1	0,0001
$ZnCl_2$	0,021
$CoCl_2.6H_2O$	0,020
$(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0,009
$CuSO_4.5H_2O$	0,02

Tabela 3-Composição meio fertilizante completo (MF) (YAMASHITA; MAGALHAES, 1984)

Nutrientes	**Concentração final (mg.L^{-1} água salgada)**
Sulfato de Amônio	150
Ureia	7.5
Superfosfato de Cálcio	25

3.2.2 Experimento 2 – A importância do ferro

O delineamento experimental do segundo experimento foi baseado nos resultados obtidos no primeiro experimento, e dessa forma houve mudanças nas condições de cultivo e no meio de cultivo escolhido. O meio utilizado neste segundo experimento, para quatro dos seis tratamentos, foi o meio de cultivo fertilizante com 1,5 vezes a concentração de sulfato de amônio do meio de cultivo com fertilizantes original (Tab. 3). Não foi utilizado o dobro de sulfato de amônio como no experimento 1, pois houve a intenção de prevenir a redução exagerada no pH do meio de cultivo

que foi observado no primeiro experimento. A escolha desse meio de cultivo se deve à tendência de alta produção de pigmentos, a alta biomassa e a quantidade de nitrogênio restante no meio ao final do experimento 1. Como meio controle foi utilizado o meio Conway (WALNE, 1966).

O experimento foi realizado em triplicatas e seis tratamentos:

A- Meio Conway
B- Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária
C- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de íon amônio.
D- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de íon amônio, com adição de ferro na fase estacionária.
E- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de íon amônio, com adição de ferro no início do cultivo.
F- Meio fertilizante com 1,5 vezes a concentração de íon amônio, com adição de ferro no início e ao atingir a fase estacionária do cultivo.

A concentração de ferro ($FeCl_3$) inicial nos meios E e F foi de 0.12mmol.L^{-1} como sugerido por HUANG et al. (2014), onde foi observado que *N. oculata* apresenta melhor crescimento. Já a adição de ferro quando os cultivos atingiram a fase estacionária foi na mesma concentração, no entanto foi feita através de uma solução de cloreto de ferro e EDTA como forma de prevenir a floculação do cultivo e ao mesmo tempo tornar os íons de ferro disponíveis para as microalgas. A formulação dos tratamentos se encontra na tabela 4.

O cultivo foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 20±2 °C, salinidade inicial foi 30, 250 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1} de iluminação, em erlenmeyers de 3 litros com 2 litros de cultivo e aeração branda constante. A densidade celular inicial foi na ordem 4 x10^6 céls.mL^{-1}. A redução na temperatura em relação ao primeiro experimento visava principalmente reduzir o aumento de salinidade no meio de cultivo devido à elevada evaporação.

3.3 DADOS ABIÓTICOS

A cada dois dias foram medidas temperatura e pH (pH-1500, Instrutherm) e a salinidade foi medida com um refratômetro. As análises de nutrientes: amônia, nitrito

e fosfato (STRICKLAND; PARSONS, 1972) e nitrato (MACKERETH; HERON; TALLING, 1978), foram feitas a cada dois dias para o experimento 1, enquanto que para o experimento 2 elas foram feitas apenas no dia 0, no dia 14 e no dia 18 do experimento, referentes ao início do experimento, início da fase estacionária e final do experimento.

Tabela 4-Composição dos tratamentos do Experimento 2.

Nutrientes ($mg.L^{-1}$)	A	B	C	D	E	F
FeCl3	1.3	1.3	0	0	19.4	19.4
MnCl2.4H2O	0.36	0.36	0	0	0	0
H3BO3	33.6	33.6	0	0	0	0
EDTA	45	45	0	0	0	0
NaH2PO4.2H2O	20	20	0	0	0	0
NaNO3	100	100	0	0	0	0
B12	0.000005	0.000005	0	0	0	0
B1	0.0001	0.0001	0	0	0	0
ZnCl2	0.021	0.021	0	0	0	0
CoCl2.6H2O	0.02	0.02	0	0	0	0
(NH4)6Mo7O24.4H2O	0.009	0.009	0	0	0	0
CuSO4.5H2O	0.02	0.02	0	0	0	0
Sulfato de Amônio	0	0	225	225	225	225
Superfosfato de Cálcio	0	0	25	25	25	25
Ureia	0	0	7.5	7.5	7.5	7.5
$FeCl_3$ na fase estacionária	0	19.4	0	19.4	0	19.4
EDTA na fase estacionária	0	24.8	0	24.8	0	24.8

3.4 BIOMASSA E DENSIDADE CELULAR

Uma alíquota de 10 mL foi fixada com lugol neutro e as células contadas em câmara de Neubauer sob um microscópio óptico com magnificação final de 400X. O crescimento específico ($\mu(dia^{-1})$) foi calculado para a fase exponencial do crescimento de acordo com Barsanti & Gualtieri (2014) usando a seguinte fórmula:

$$\mu = \frac{\ln \frac{N2}{N1}}{t2 - t1}$$

Onde N1 e N2 são o número de células nos tempos t1 e t2.

A biomassa foi estimada através do peso seco (STRICKLAND; PARSONS, 1972). A cada dois dias uma alíquota de 25 mL à10 mL foi filtrada em um filtro previamente pesado em balança analítica e lavado com formiato de amônio (0,5M) para remoção do sal (ZHU; LEE, 1997). Depois foram levados a estufa para secarem em 60°C por aproximadamente 48 horas. Após esse período os filtros foram novamente pesados para estimar a biomassa de cada tratamento. A biomassa foi calculada através da fórmula: $Biomassa = \frac{P_f - P_i}{V}$

Onde P_f é o peso final P_i é o peso inicial e V é o volume filtrado em litros.

3.5 PIGMENTOS

Para o primeiro experimento foram filtrados cinco mililitros de cada amostra no dia zero, no quarto dia foram filtrados três mililitros e nos dias oito e dez foram filtrados dois mililitros de amostra dos cultivos, os diferentes valores foram escolhidos de acordo com a densidade do cultivo e avaliação visual das filtragens. As filtrações foram feitas utilizando um *manifold* de seis copos e filtros GF/F de 25 mm, após as filtrações os filtros eram dobrados, colocados em criotubos previamente identificados e colocados em gelo seco, depois eram levados para o ultrafreezer (-80°C) onde foram mantidos por aproximadamente 30 dias até serem colocados em tanque de nitrogênio líquido. As amostras na hora da extração eram retiradas do nitrogênio líquido, picotadas com uma tesoura, colocadas em um tubo para centrifuga encaixado em um tubo falcon. No tubo eram então adicionados 3 ml de Metanol grau HPLC contendo trans-β-apo-8'-carotenal como padrão interno, fechados com parafilme e mantidos no freezer por uma hora. Após uma hora no freezer a amostra era sonicada por 30 segundos a 40Hz e depois centrifugada por 5 minutos a 4800 RPM e -4°C. Adicionava-se mais um mililitro de metanol e a amostra era centrifugada por mais 3 minutos. O volume de extrato era aferido em uma seringa e filtrado com membrana(0.2µm) para um vial (para ser usado para análise) e em dois criotubos para armazenamento em ultrafreezer e nitrogênio líquido.

Já para o segundo experimento o método utilizado foi diferente. Nos dias zero, 14 e 18, (referentes ao início do experimento, início da fase estacionária e fim do experimento) foram centrifugados quatro mililitros de cada amostra em tubo falcon de quinze mililitros por trinta minutos a 3600 RPM, o sobrenadante era removido

manualmente procurando manter a integridade do pellet. As amostras foram então armazenadas no ultrafrezer (-80°C) até o momento da extração. O procedimento de extração foi o mesmo do experimento 1.

Imediatamente antes da injeção, 400µL do extrato eram misturados com 100µL de tampão de piridina, quando necessário o extrato era diluído com metanol. A análise em HPLC foi realizada de acordo com a metodologia proposta por ZAPATA; RODRÍGUEZ; GARRIDO (2000). Foi utilizada uma coluna C8 Ascentis Express (15cm x 3mm x 2,7µm), o eluente A era composto por Acetonitrila:Metanol:Acetona (20:20:60), o eluente B era composto por Metanol:Acetonitrila:Piridina(0,025M) (50:25:25) e o gradiente dos eluentes é apresentado na tabela 5. O loop de injeção utilizado foi de 50µL e o fluxo de 0,5mL.min^{-1}. Os pigmentos foram identificados através do tempo de retenção e espectro de absorbância do sinal obtido por um detector de fotodiodos (Acella PDA detector, ThermoScientific). A concentração dos pigmentos nas amostras foi calculada com base em curvas feitas com padrões da DHI (Dinamarca). A integração dos picos foi realizada utilizando o software ChromQuest 4.1, as integrações foram checadas manualmente e corrigidas quando necessário.

Tabela 5-Gradiente dos eluentes para análise no HPLC.

TEMPO (min)	A (%)	B (%)
0	0	100
22	40	60
28	90	10
38	90	10
42	0	100
43	0	100

3.6 ÁCIDOS GRAXOS

No último dia (Dia 18) do segundo experimento, a biomassa de 180 mL de cultura de cada réplica foi coletada através de centrifugação a 3000 RPM por 40 minutos, e duas vezes lavada com água destilada e centrifugada por 10 minutos. A biomassa foi colocada então em placas de petri e levada para secar em estufa a 60°C por 24 horas. Depois desse período a biomassa foi raspada das placas, colocada em tubos falcon previamente identificados e levada ao ultra freezer (-80°C) para ser preservada até o momento da extração dos ácidos graxos. Anteriormente `a extração as amostras foram liofilizadas de um dia para o outro.

Para a extração das amostras, a biomassa foi pesada em balança de precisão. A extração foi feita com 5 mL de uma solução de diclorometano: metanol (2:1, v/v), 15 minutos em ultrassom, e então centrifugação por 4 minutos a 4000 RPM; após a centrifugação o sobrenadante foi colocado em um balão. Esse processo foi repetido de três a quatro vezes por amostra, ou até que o sobrenadante não apresentasse mais coloração. Os extratos foram concentrados em rota evaporador Buchi e então transferidos para *vials* de 8 mL, onde foram secos sob fluxo de nitrogênio. Os extratos foram então recuperados com 1mL de diclorometano. Para a saponificação foram utilizados 250 µL de extrato, 50 µL de padrão FAME-C19 e 3 mL de hidróxido de potássio (0,1 $mol.L^{-1}$) e deixados em placa aquecida a 85°C por duas horas. Após as duas horas as amostras eram tiradas e deixadas para esfriar. Depois de frias eram adicionados 2 mL de hexano, a amostra era agitada em vortex, e deixada para descansar; a camada superior (fração neutra) era então transferida para vial limpo. A fração ácida foi seca em nitrogênio e então acidificada com 2 mL de uma solução de ácido clorídrico (3M), após a acidificação foram feitas mais três extrações com hexano, e a fase orgânica foi transferida para *vial* limpo. O extrato orgânico foi reduzido em fluxo de N_2 para a realização da metilação. Para a metilação eram adicionados 2mL de uma solução BF-3-MeOH (3%) e deixados em placa aquecida por uma hora a 85°C, após a metilação foram feitas duas extrações com 2mL de hexano e a fração metilada era transferida para um novo vial. A fração metilada passou por um *clean-up* em uma coluna de sílica e sulfato de sódio.

Os extratos metilados foram levados a fluxo de nitrogênio até a secura e reeluídos em 100 µL de n-hexano e adicionados 2500 ng de C24-d como padrão interno. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por meio da injeção de padrões certificados (FAME 37 Mix da Supelco) para verificação do tempo de retenção de cada composto. Os ácidos graxos foram identificados por cromatografia a gás com detecção por detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas em um Trace GC Ultra (ThermoScientific) com um injetor modo *splitless.* O volume de injeção foi de 1µl, a temperatura do injetor de 240°C e o gás de arraste He (UP) (1,5 $mL.min^{-1}$, fluxo constante). A temperatura do aquecedor do detector foi mantida em 280°C e o desvio de ignição de 0,3 pA. As condições de operação do cromatógrafo foram: temperatura inicial de 60°C, seguido por um gradiente de 30°C/min até atingir 170°C, e em seguida um gradiente de 2°C/min até atingir 215°C que era então mantido

por 12 minutos, e por fim um gradiente de 20°C/min até atingir 240°C que era mantido por mais 15 minutos. O tempo de equilíbrio era de 0,5 minutos e o tempo total de cada corrida de 54,42 minutos. A coluna utilizada foi uma DB-23 60m (P/N: 123-2362) com diâmetro interno de 0,32mm e espessura do filme de 0,25µm. Foi utilizada a estação de dados ChromQuest 4.1.

3.7 FLUORIMENTRIA PAM

Para o Experimento 2 a cada dois dias a eficiência fotossintética foi determinada por medidas de fluorescência de clorofila do fotossistema II (PSII) com um fluorímetro de pulso modulado (PAM), Mini-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha e software Win-Control). Para essas medidas eram usadas 10 mL de amostra colocadas em tubos falcon de 15 mL. As amostras eram deixadas no escuro por 20 minutos para relaxamento do PSII antes das medições (WHITE; ANANDRAJ; BUX, 2011). Inicialmente uma luz fraca (0,15 µmol fótons m^2s^{-1}) induz a fluorescência sem que ocorra a fotossíntese e essa medida é denominada F_0; em seguida um pulso de saturação (>10.000µmol fótons $m^{-2}s^{-1}$, 0.4-0.8s) fecha todos os centros de reação do PSII, resultando na máxima fluorescência (Fm). Com esses dados é possível calcular a eficiência fotossintética através da fórmula: Fv/Fm = (Fm – Fo)/ Fm.

No décimo quarto dia e no décimo oitavo dia foram feitas curvas de luz rápidas (RLCs) para todas as amostras. As RLCs foram feitas com o Mini-PAM, com a intensidade de luz actinica aumentando por 4 minutos, em 8 graus de intensidade de radiação fotossinteticamente ativa (PAR). A cada 30 segundos era emitido um pulso de luz actinica de 0.8 segundos das seguintes intensidades: 0, 34, 208, 218, 339, 504, 685, 999 e 1337 µmol fotons.m^{-2}.s^{-1}. A partir dos dados obtidos o software Win-Control calculou os valores da taxa de transporte de elétrons máxima (ETRm), a radiância mínima de saturação (Ek), o ângulo de inclinação da curva de saturação (α) e a dissipação não fotoquímica (NPQ).

3.8 ANÁLISE ECONÔMICA

Para o experimento 1 foi realizada uma análise dos custos onde foi considerado que a única diferença entre os tratamentos foi o custo do meio de cultivo, sem considerar os outros gastos. O custo para o meio de cultivo foi calculado de acordo com a concentração final de cada elemento no meio, em miligrama por litro,

multiplicado pelo preço de um miligrama deste reagente. Os preços dos reagentes foram retirados dos websites das empresas Sigma-aldrich (https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html) e Synth (https://www.lojasynth.com/synth). Para calcular o custo da produção da biomassa e do total de carotenoides foi utilizado o valor médio máximo para cada tratamento.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a diferença entre os tratamentos utilizou-se a análise de variância (ANOVA); quando as premissas não eram obedecidas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (software Statistica 12), considerando $\alpha=0,05$. Foi feito o teste post-hoc de Tukey (ZAR, 2010). Os gráficos, as médias e os desvios foram feitos no software R (R Core Team, 2015).

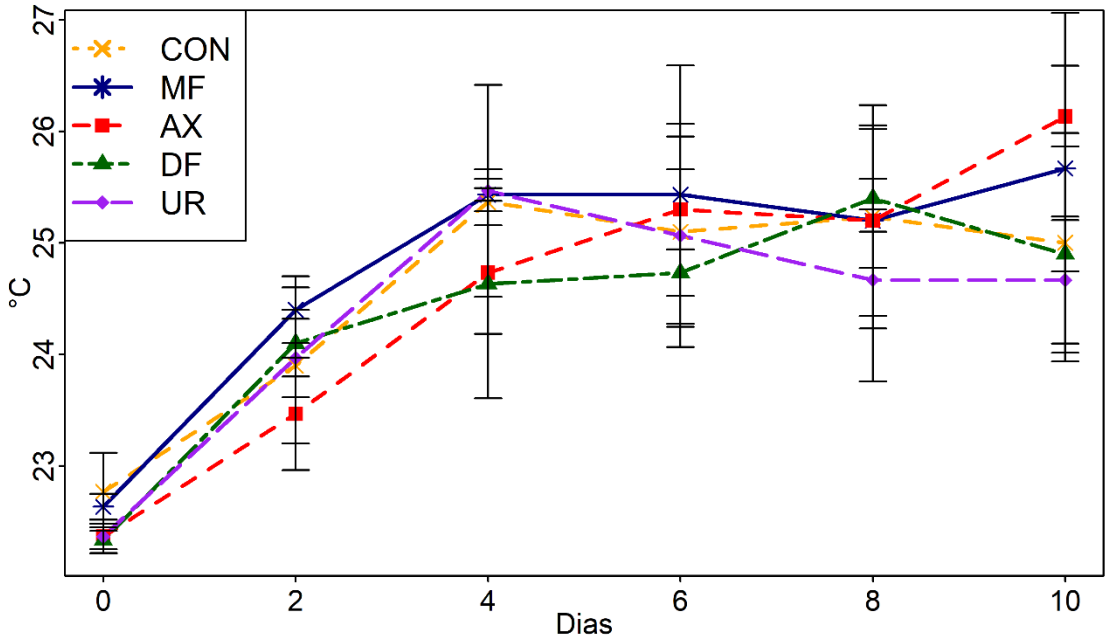
4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Temperatura, salinidade e pH

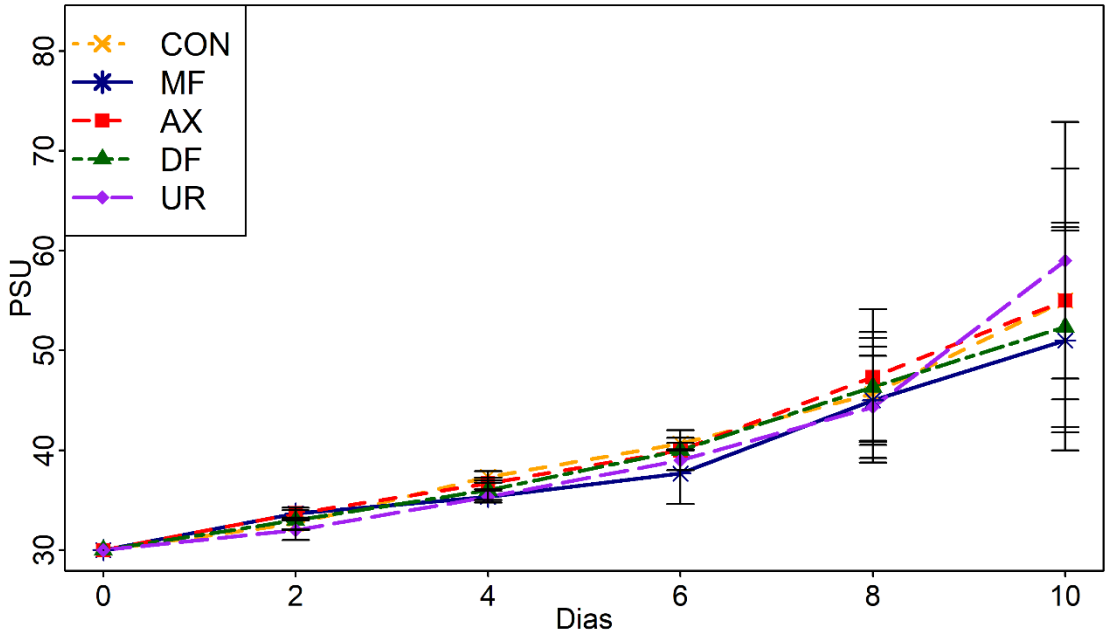
A temperatura (Fig.2) apresentada no dia 0 foi a mais baixa durante o período do experimento, com média de 22,49±0.19 °C para todos os tratamentos. Não houve diferença significativa na temperatura entre os tratamentos para nenhum dos dias (p>0,05). As temperaturas aumentaram até o quarto dia onde se estabilizaram (25,17±0,38°C).

Figura 2- Temperatura (°C) média e desvio padrão para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento.



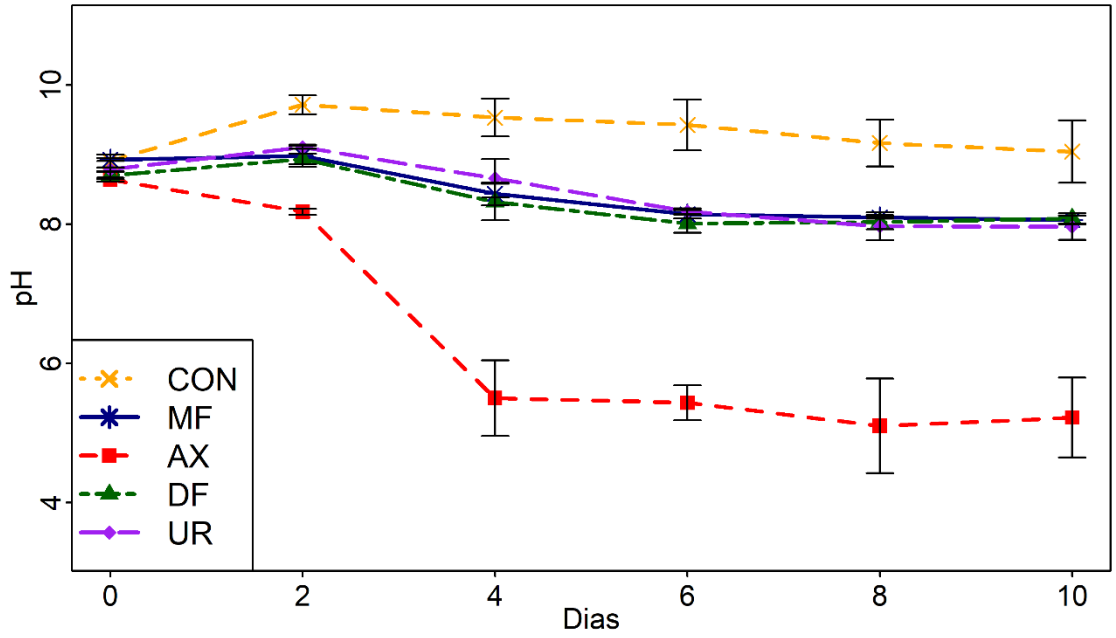
A salinidade (Fig. 3) inicial foi de 30 para todos os tratamentos e não apresentou diferença significativa entre os tratamentos para nenhum dos dias do experimento (p>0,05). Durante todo o período houve incremento da salinidade que atingiu seu valor máximo observado no tratamento UR (59±13) no décimo dia. Os valores finais de salinidade observados foram 55±13 para o CON, 55±8 para AX, 52±10 para DF e 51±11 para MF.

Figura 3- Salinidade (PSU) média e desvio padrão para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento.



O pH inicial (Fig.4) foi significativamente ($p<0,02$) mais baixo para o tratamento AX, que apresentou pH no valor de 8,64±0,026. Os outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas no dia 0. No entanto, a partir do dia 2 o tratamento com meio Conway apresentou valores mais altos de pH (9,59±0,13), enquanto que o tratamento AX apresentou uma queda no pH, aumentando a diferença para os outros tratamentos (8,15±0,04). MF, UR e DF apresentaram valores de pH de 8,81±0,15, 9,08±0,02 e 8,87±0,07, respectivamente. O pH no quarto dia apresentou uma pequena queda para todos os tratamentos, com exceção do tratamento AX que teve uma maior redução. Os valores de pH de AX e de CON foram significativamente ($p<0,02$) diferentes do restante, com valores mais baixos pra AX (4,9±0,54) e mais altos para CON (9,23±0,27). A partir do quarto dia as diferenças se mantiveram, mas o pH dos tratamentos sofreu apenas pequenas variações. No décimo dia os valores encontrados foram CON (8,74±0,44), AX (4,56±0,57), DF (8±0,07), MF (7,99±0,06) e UR (7,77±0,19), com CON e AX significativamente diferentes do restante ($p<0,03$).

Figura 4 – pH médio e desvio padrão para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento.



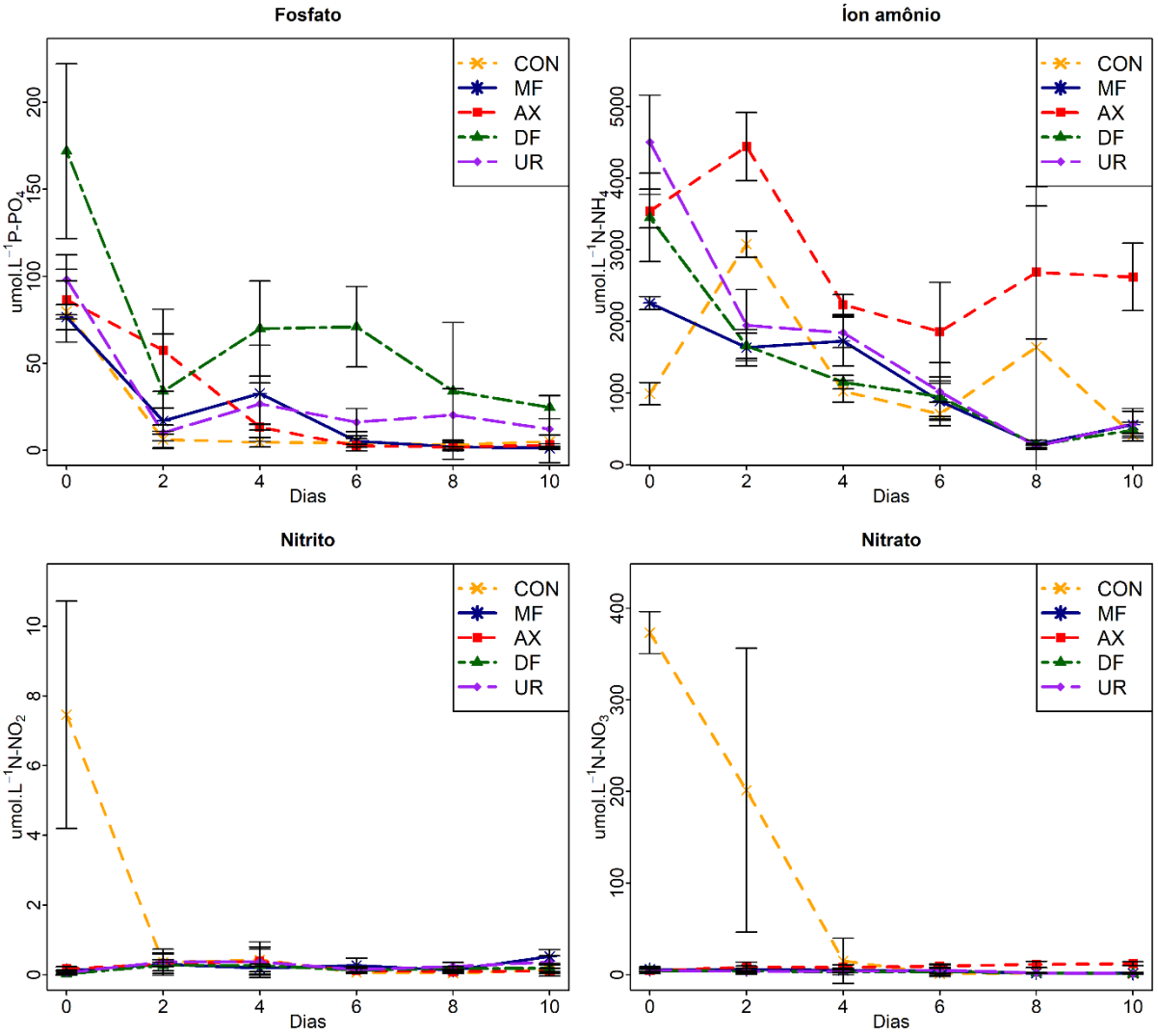
4.1.2 Nutrientes

As concentrações iniciais de fosfato (Fig. 5) não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) inicialmente, apesar de valores mais elevados encontrados no meio DF (171,81±50,12 µmol.L^{-1} P-PO_4). Os valores iniciais para os outros tratamentos foram: para CON de 79,76±17,62 µmol.L^{-1} P-PO_4, para AX de 86,54±17,33 µmol.L^{-1} P-PO_4, para MF de 76,57±1,24 µmol.L^{-1} P-PO_4 e para UR de 98,03±14,22 µmol.L^{-1} P-PO_4. Ao decorrer do experimento ocorreu uma redução na concentração de P-PO_4 em todos os tratamentos, sendo que ocorreram diferenças significativas (p<0,05) nos dias 2, 4 e 6. No dia 2 AX apresentou valores mais altos (57,43±23,68 µmol.L^{-1} P-PO_4), enquanto que nos dias 4 e 6 os valores mais altos ocorreram no meio DF (69,9± 27,34 µmol.L^{-1} P-PO_4 e 70,99±23,1 µmol.L^{-1} P-PO_4). Os valores finais e mais baixos ocorreram no último dia (Dia 10), para o meio CON o valor final foi 5,08±3,72 µmol.L^{-1} P-PO_4, para AX foi 3,05±0,07 µmol.L^{-1} P-PO_4, para DF foi 24,71±6,49 µmol.L^{-1} P-PO_4, para MF foi 1,25±0,59 µmol.L^{-1} P-PO_4 e para UR foi 12,17±19,29 µmol.L^{-1} P-PO_4.

As concentrações de nitrito (Fig. 5) iniciais foram significativamente (p<0,05) maiores para CON que teve valor inicial de 7,45±3,26 µmol.L^{-1} N-NO_2. Os outros

tratamentos tiveram valores bem mais baixos, entre 0 e 0,16 µmol.L^{-1} N-NO_2. Já no segundo dia a concentração de nitrito no tratamento com meio Conway caiu drasticamente e se aproximou dos valores encontrados para os outros tratamentos, sem diferenças significativas e sem grandes variações até o final do experimento. Os valores finais de concentração para os tratamentos foram de 0,13±0,17 µmol.L^{-1} N-NO_2 para CON, 0,11±0,07 µmol.L^{-1} N-NO_2 para AX, 0,19±0,09 µmol.L^{-1} N-NO_2 para DF, 0,52±0,2 µmol.L^{-1} N-NO_2 para MF e 0,36±0,18 µmol.L^{-1} N-NO_2 para UR.

Figura 5- Evolução da concentração média de nutrientes (Fosfato, Amônia, Nitrito e Nitrato) para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento.



As concentrações de nitrato (Fig.5) iniciais foram significativamente ($p<0,05$) mais altas para o tratamento CON (373,37±22,92 µmol.L^{-1} N-NO_3). Os valores iniciais

para os outros tratamentos foram: 4,52±2,02 µmol.L^{-1} N-NO_3 para AX, 4,21±2,83 µmol.L^{-1} N-NO_3 para DF, 5,79±2,65 µmol.L^{-1} N-NO_3para MF e 4,73±1 µmol.L^{-1} N-NO_3 para UR. A concentração de nitrato no tratamento CON diminuiu drasticamente até o quarto dia quando atingiu concentração mais próxima ao dos outros tratamentos (15,03±24,65 µmol.L^{-1} N-NO3) enquanto que AX teve 7,81±2,93 µmol.L^{-1} N-NO_3, DF teve 2,95±2,95 µmol.L^{-1} N-NO_3, MF teve 4,75±2,09 µmol.L^{-1} N-NO_3 e UR teve 3,46±1,62 µmol.L^{-1} N-NO_3. Após o quarto dia os valores diminuíram para todos os tratamentos, com exceção de AX que aumentou, os valores no último dia foram 0,85±0,22, 11,84±2,06, 0,91±0,39, 1,4±0,81 e 1,01±0,23 µmol.L^{-1} N-NO_3 para CON, AX, DF, MF e UR respectivamente.

As concentrações iniciais de amônia (Fig.5) foram significativamente diferentes ($p<0,02$) com menores valores encontrados no tratamento CON (995,43±154,9 µmol.L^{-1} N-NH_4), seguido por MF (2258,22±90,89 µmol.L^{-1} N-NH_4), DF (3453,14±615,84 µmol.L^{-1} N-NH_4), AX (3541,58±232,74 µmol.L^{-1} N-NH_4) e UR (4501,1±654,95 µmol.L^{-1} N-NH_4). No segundo dia houve uma queda nas concentrações dos tratamentos DF, MF e UR, que atingiram 1661,8±176,95, 1637,82±252,27 e 1949,62±494,29 µmol.L^{-1} N-NH_4, respectivamente. Enquanto que em CON e AX houve aumento e chegaram a 3080,88±183,07 e 4442,4±475,81 µmol.L^{-1} N-NH_4. Sendo que AX foi significativamente mais alto do que o restante ($p<0,05$). No quarto dia AX continuou com valores significativamente ($p<0,02$) mais altos de amônia (2237,44±138,8 µmol.L^{-1} N-NH_4) do que CON (1027,92±149,31 µmol.L^{-1} N-NH_4), DF (1154,69±95,51 µmol.L^{-1} N-NH_4), MF (1726,9±348,13 µmol.L^{-1} N-NH_4) e UR (1846,83±212,24 µmol.L^{-1} N-NH_4). No sexto dia os valores continuaram decrescendo sem diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). No oitavo dia houve aumento em AX (2688,01±927,54 µmol.L^{-1} N-NH_4) e CON (1644,67±2238,94 µmol.L^{-1} N-NH_4). AX foi significativamente mais alto que o restante ($p<0,05$). Os outros tratamentos tiveram uma redução na concentração de amônia com valores de 280,98±61,96, 287,81±13,59 e 260,44±20,77 µmol.L^{-1} N-NH_4, para DF, MF e UR respectivamente. No décimo dia a concentração de amônia em AX diminuiu um pouco e chegou a 2622,91±471,12 µmol.L^{-1} N-NH_4 e foi significativamente maior que o restante ($p<0,01$). Em CON a concentração de amônia também diminuiu com valor final de 419,73±18,04 µmol.L^{-1} N-NH_4. Os restantes dos tratamentos tiveram um leve incremento nas concentrações de amônia com valores finais de 486,54±109,79

µmol.L^{-1} N-NH_4 para DF, 561,93±225,22 µmol.L^{-1} N-NH_4 para MF e 575,63±174,51 µmol.L^{-1} N-NH_4 para UR.

4.1.3 Biomassa e densidade celular

A abundância celular (Fig. 6) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos para nenhum dos dias do experimento ($p>0,05$). Os valores iniciais da abundância celular foram para CON de 1,2±0,06 x 10^7. Céls.mL^{-1}, para AX de 1,11±0,04 x 10^7. Céls.mL^{-1}, para DF de 1,06±0,14 x 10^7. Céls.mL^{-1}, para MF de 1,1±0,14 x 10^7.Céls.mL^{-1} e para UR de 1,18±0,11 x 10^7. Céls.mL^{-1}. Todos os tratamentos apresentaram grande crescimento até o oitavo dia, onde com exceção do tratamento MF todos atingiram a abundância celular máxima durante o período do experimento, sem diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,2$). Os valores encontrados foram de 5,7±0,5 x 10^7. Céls.mL^{-1}, 5,2 ± 0,9 x 10^7. Céls.mL^{-1}, 7,2±2,1 x 10^7. Céls.mL^{-1}, 7,1±2,1 x 10^7. Céls.mL^{-1} e 5,9±1,4 x 10^7. Céls.mL^{-1}, para os tratamentos CON, AX, MF, DF e UR respectivamente. No décimo dia apenas MF apresentou um pequeno crescimento com abundância final de 7,5±0,8 x 10^7. Céls.mL^{-1}, mas isso não gerou diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,2$). As abundâncias finais foram 5,3±1,4 x 10^7. Céls.mL^{-1} para CON, 5,02±1,2 x 10^7. Céls.mL^{-1} para AX, 6,8±1,4 x 10^7. Céls.mL^{-1} para DF e 5,7±1,7 x 10^7 Céls.mL^{-1} para UR. O crescimento específico (Tab. 6) também não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos com valores pouco mais elevados para o tratamento DF.

Em relação à biomassa (g.L^{-1}) (Fig.7) não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos desde o início ($p>0,7$) até o último dia ($p>0,4$), quando atingiram as maiores biomassas. Houve crescimento quase que constante até o final do experimento. Os valores iniciais foram 0,12±0,04 g.L^{-1}, 0,11±0,02 g.L^{-1}, 0,11±0,06 g.L^{-1}, 0,14±0,02 g.L^{-1} e 0,13±0,05 g.L^{-1} para CON, AX, DF, MF e UR respectivamente. Enquanto que os valores finais foram 1,5±0,75 g.L^{-1}, 0,83±0,11 g.L^{-1}, 1,23±0,15 g.L^{-1}, 1,2±0,36 g.L^{-1} e 1.2±0,52 g.L^{-1}.

Tabela 6- Crescimento específico (μ(dia^{-1})) calculado para os tratamentos CON (meio Conway), MF (meio fertilizante), AX (meio fertilizante com o dobro de amônia), DF (meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR (meio fertilizante com o dobro de ureia), com média e desvio padrão.

Crescimento específico (μ(dia^{-1})

Tratamento	Média	Desvio
AX	0,19	0,03
CON	0,19	0,02
DF	0,24	0,04
MF	0,19	0,02
UR	0,20	0,03

Figura 6- Densidade celular média e desvio padrão (céls.ml^{-1}) para os tratamentos CON (meio Conway), MF (meio fertilizante), AX (meio fertilizante com o dobro de amônia), DF (meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR (meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento.

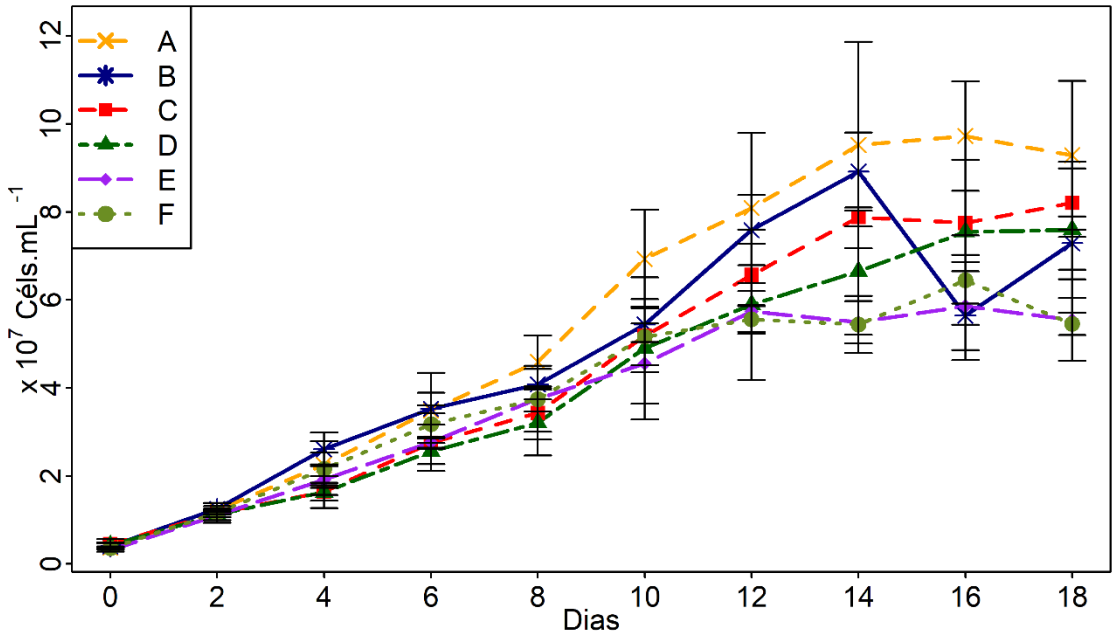
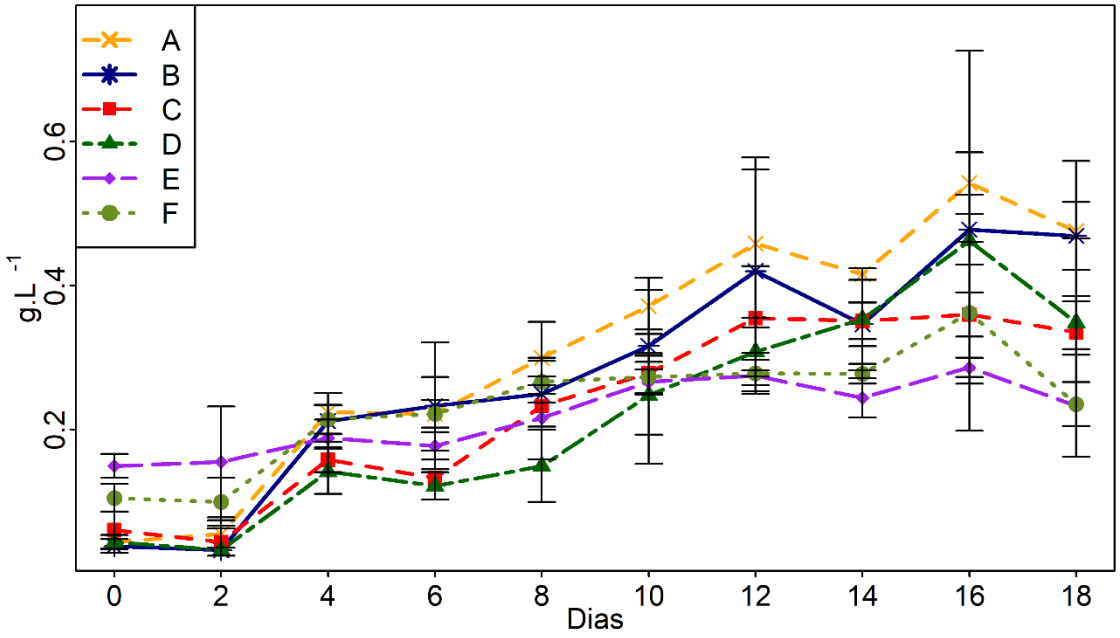


Figura 7- Biomassa média e desvio padrão (g.L^{-1}) para os tratamentos CON (meio Conway), MF (meio fertilizante), AX (meio fertilizante com o dobro de amônia), DF (meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR (meio fertilizante com o dobro de ureia), ao decorrer dos dez dias de experimento.

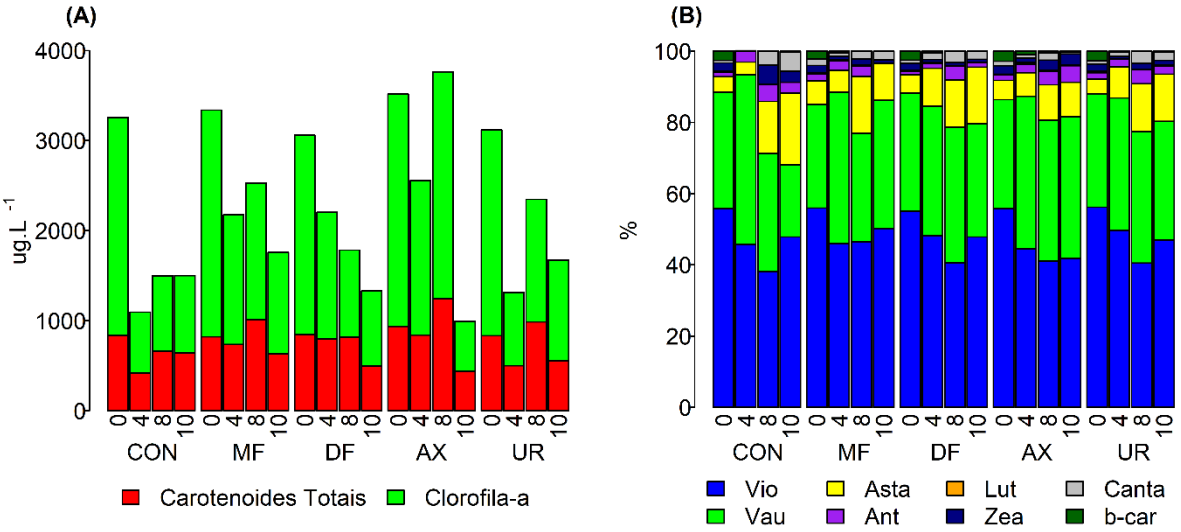


4.1.4 Perfil pigmentar

Não houve diferenças significativas (p>0,05) entre os perfis pigmentares (Fig. 8) dos tratamentos durante todo o tratamento; a composição média para todos os dias do experimento e para todos os tratamentos foi de 1470± 811 µg.L^{-1} de clorofila-*a* e de 753±298 µg.L^{-1} de carotenoides. Entre os carotenoides a maior parte é representada por violaxantina (47,6±6,8 % dos carotenoides), seguido por vaucheraxantina (35,3±7,6 % dos carotenoides), astaxantina (10±5,3% dos carotenoides), anteraxantina (2,5±1,6% dos carotenoides), cantaxantina (1,9±1,4 % de carotenoides), zeaxantina (1,8±2,1 % dos carotenoides), beta-caroteno (0,8±1,1 % dos carotenoides) e luteína (0,2±0,2 % dos carotenoides). A razão entre carotenoides totais e clorofila-*a* foi em média 0,6±0,2. No quarto dia houve uma redução no total de carotenoides e na concentração de clorofila-a em todos os tratamentos, sendo que os valores mais baixos ocorreram nos tratamentos CON e UR para ambas variáveis, no entanto essa diferença não foi significativamente diferente. O tratamento com meio Conway (CON) apresentou concentrações abaixo do nível de detecção do método para luteína, zeaxantina e betacaroteno. O tratamento UR também não apresentou luteína e betacaroteno. No oitavo dia as concentrações de carotenoides aumentaram para todos os tratamentos, sendo que para os tratamentos AX, UR e MF foram os

valores máximos. A concentração de clorofila-*a* também aumentou, com exceção do tratamento DF onde a concentração de clorofila-a diminuiu. A concentração de carotenoides totais em AX no oitavo dia foi de 1245±291µg.L^{-1}, com 41±11.7% de Vio, 9,9±4 % de astaxantina, 39±5,9 % de Vau. A concentração de clorofila-*a* foi 2519±915 µg.L^{-1}. Para MF a concentração de carotenoides totais foi de 1011±344 µg.L^{-1}, e para UR foi de 987±324µg.L^{-1}. Com porcentagens similares as apresentadas pelo tratamento AX. No décimo dia apenas o tratamento CON manteve as concentrações semelhantes em relação ao oitavo dia, todos os outros tratamentos apresentaram uma queda tanto na concentração de carotenoides como na concentração de clorofila-*a*.

Figura 8- Concentração média (µg.L^{-1}) de clorofila-a e carotenoides totais (a) e porcentagem média dos carotenoides violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car) (b), para os tratamentos CON (meio Conway), MF(meio fertilizante), AX(meio fertilizante com o dobro de amônia), DF(meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR(meio fertilizante com o dobro de ureia), nos dias 0, 4, 8 e 10.



4.1.5 Análise Econômica

Quando analisado o custo para produção de um quilograma de biomassa de *Nannochloropsis oculata* (Tab. 7) o valor observado para o tratamento com o meio Conway (CON – 157,75±63,19 R$/Kg) é cerca de trinta vezes superior ao segundo tratamento mais custoso, tratamento DF(5,30R$±0,64). O valor mais baixo foi observado para o tratamento MF, cujo custo foi de 3,28±1,14R$/Kg. Já em relação a produção de carotenoides o custo mais elevado foi novamente para CON (1019,38±157,46R$/g) cerca de 45 vezes maior do que DF (23,22±7,12 R$/g) que foi o segundo tratamento com maior custo para produção de um grama de carotenoides.

O tratamento mais barato para a produção de carotenoides totais foi o com o dobro de concentração de sulfato de amônia (AX – 7,16±0,95R$/Kg).

Tabela 7-Custos calculados em reais para produção de um quilograma de biomassa de *N. oculata* (R$/Kg) e para produção de um grama de carotenoides totais (R$/g), levando em consideração apenas os valores do meio de cultivo. Para os tratamentos CON (meio Conway), MF (meio fertilizante), AX (meio fertilizante com o dobro de amônia), DF (meio fertilizante com o dobro de fosfato) e UR (meio fertilizante com o dobro de ureia).

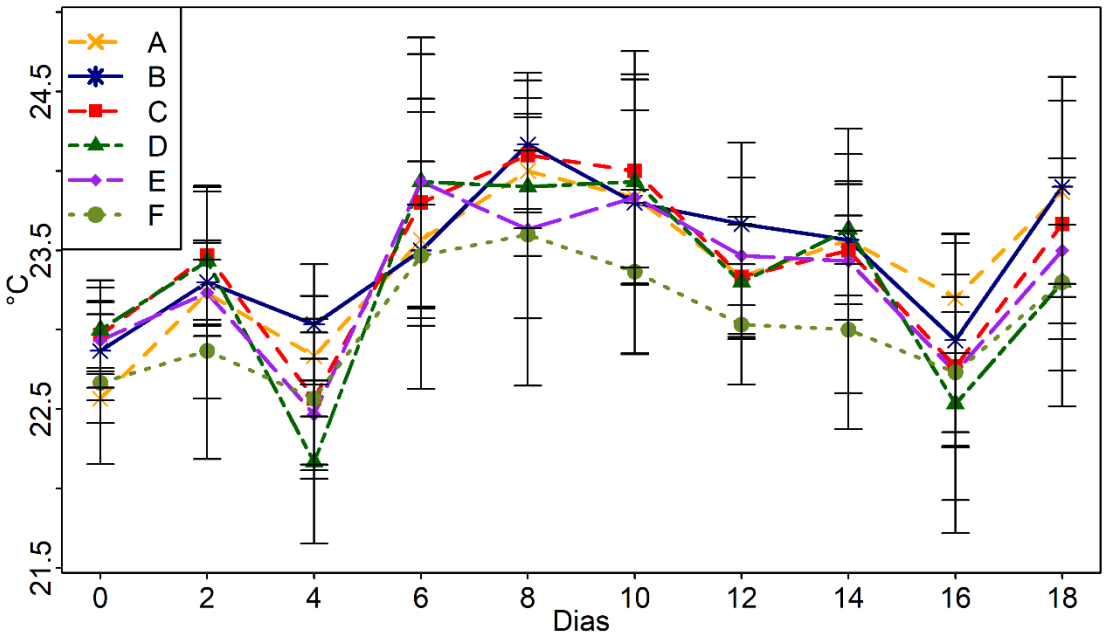
	Custo biomassa (R$/Kg)		Custo Carotenoides(R$/g)	
Tratamento	Média	Desvio	Média	Desvio
CON	157.75	63.20	1019.38	157.46
AX	4.16	0.63	7.16	0.95
DF	5.30	0.64	23.22	7.12
MF	3.28	1.14	13.84	6.80
UR	3.54	2.04	10.51	3.10

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Temperatura, salinidade e pH

A temperatura (Fig. 9) não apresentou diferença significativa durante o experimento, entre os dias e entre os tratamentos (p>0,05). A média foi de 23,33±0,65 °C, a temperatura máxima encontrada foi no sexto dia 24,9°C enquanto a mínima foi no quarto dia 21,6°C. As diferenças de temperatura estão relacionadas com a movimentação dentro da sala de cultivo que é utilizada por muitas pessoas, tanto que a temperatura mais baixa foi durante um final de semana.

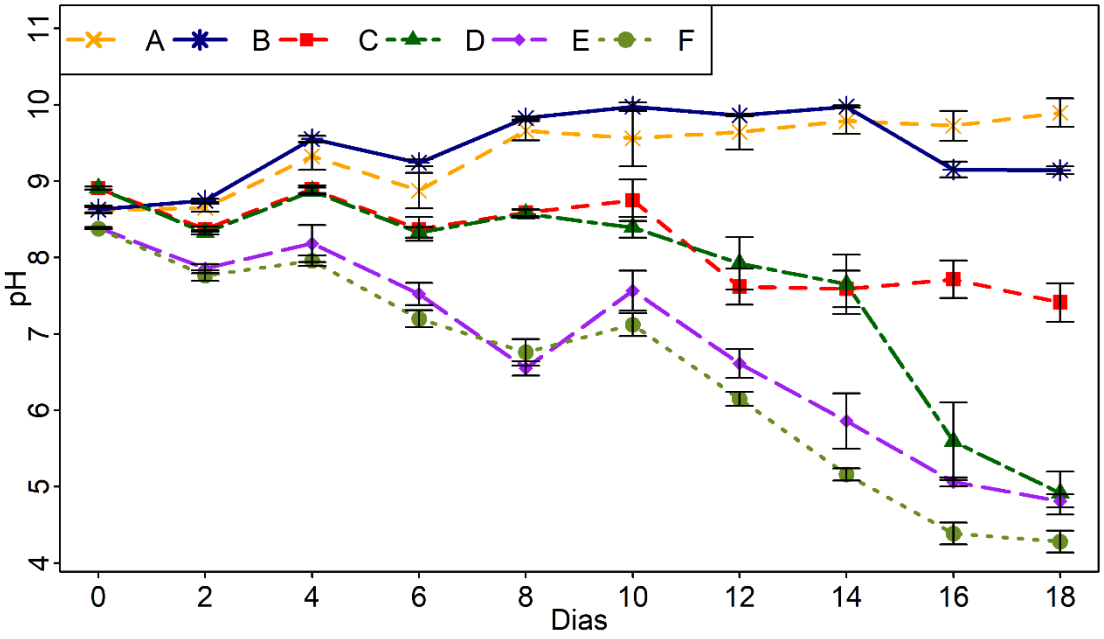
Figura 9- Temperatura média e desvio padrão (°C) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) durante os 18 dias de experimento.



O pH (Fig. 10) variou de acordo com o meio de cultivo utilizado, sendo que nos meios contendo sulfato de amônio em sua composição o pH tendeu a diminuir com o passar do tempo, enquanto que nos tratamentos com o meio Conway a tendência foi de aumento. Os valores de pH foram significativamente diferentes todos os dias (p<0,001), sendo que inicialmente C e D apresentaram valores mais altos (8,91±0,017 para ambos), seguidos de A e B (8,62±0,03 e 8,63±0,049, respectivamente) e com valores mais baixos estavam E e F (8,39±0,01 e 8,38±0,01, respectivamente). No segundo dia os valores apresentados foram para A 8,65±0,05, para B 8,75±0,023, 8,37±0,031 para C, 8,33±0,026 para D, 7,86±0,061 para E e 7,76±0,07 para F. No

quarto dia os valores aumentaram pra A e B (9,33±0,18 e 9,55±0,038 respectivamente),para C e D (8,89±0,05 e 8,87±0,046) e para E e F (8,18±0,24 e 7,96±0,07). Após esse período os valores voltaram a diminuir para C e D com 8,37±0,155 e 8,33±0,069 no sexto dia, assim como para E e F (7,52±0,146 e 7,20±0,113) e para A e B (8,88±0,235 e 9,24±0,046). A e B oscilaram, mas com uma tendência de aumento até o décimo quarto dia quando chegaram a 9,79±0,173 e 9,98±0,015 respectivamente. Os outros tratamentos continuaram diminuindo com valores intermediários para C e D (7,59±0,24 e 7,65±0,39) e valores mais baixos para E e F (5,86±0,364 e 5,16±0,08, respectivamente). Após a adição de ferro no décimo quarto dia os tratamentos B, D e F tenderam a diminuir de forma mais drástica o pH chegando a 9,14±0,051, 4,92±0,282 e 4,28±0,143, respectivamente. A apresentou leve aumento de pH chegando a 9,9±0,188, enquanto que C chegou a 7,41±0,252 e E a 4,81±0,085. As diferenças ao final do experimento foram significativas entre os tratamentos (df=5, F=505,31, p<0,001), e a diferença entre D e E não foram significativas de acordo com o teste *post-hoc* de Tukey (p>0,05).

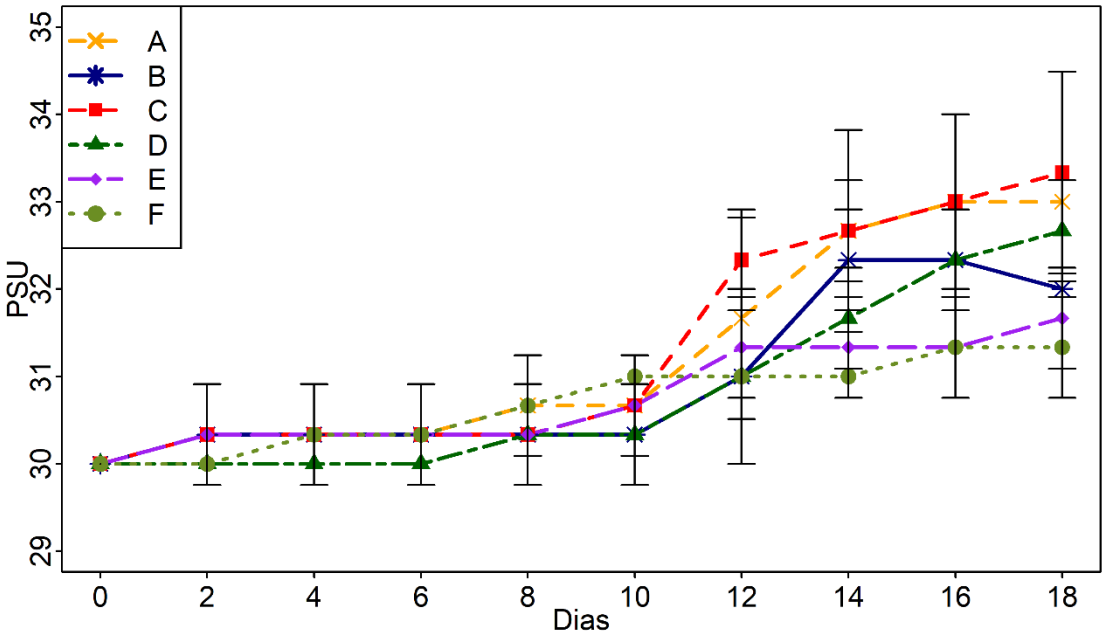
Figura 10 Média e desvio padrão dos valores de pH para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C (Meio fertilizante adaptado), D (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) durante os 18 dias de experimento.



A salinidade (Fig. 11) não apresentou diferenças significativas inicialmente, sendo que todas as réplicas começaram com salinidade 30, ao decorrer do tempo a

salinidade aumentou para todos os tratamentos com diferenças significativas a partir do décimo quarto dia (df=5, F=3,43 , p<0,05) onde os tratamentos E e F(31.33±0,577 e 31±0) apresentaram valores ligeiramente mais baixos que o restante (A=32,67±0,577, B=32,33±0,57, C=32,67±1,15 e D=31,33±0,577). As máximas salinidades ocorreram no último dia com diferença significativa entre C e F (df=5, F=4,8, p<0,05), os valores de salinidades atingidos foram 33±0 para A, 32±0 para B, 33,33±1,155 para C, 32,67±0,577 para D, 31,67±0,577 para E e 31,33±0,577 para F.

Figura 11-Salinidade média e desvio padrão (PSU) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) durante os 18 dias de experimento.

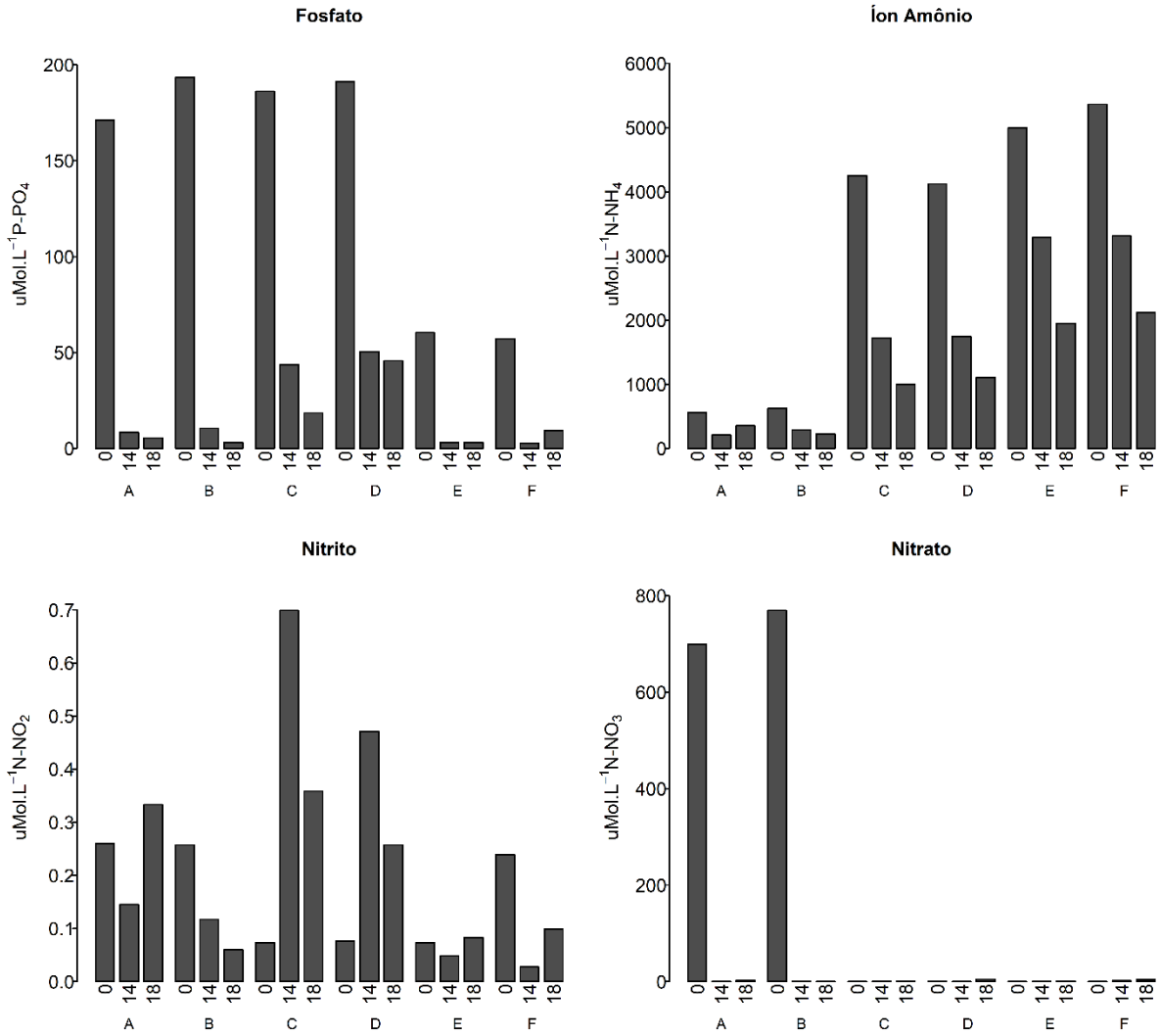


4.2.2 Nutrientes

A concentração de fósforo (Fig. 12) no início do experimento foi significativamente mais baixa para E e F (df=5, F=70,472, p<0,001), com concentrações de 60,41±1,41 µmol.L^{-1} e 57,14±6,96 µmol.L^{-1} de P-PO_4 respectivamente. As concentrações de A, B, C e D foram 171,02±20,65 µmol.L^{-1}, 193,47±5,34 µmol.L^{-1}, 186,12±20,89 µmol.L^{-1} e 191,02±12,90 µmol.L^{-1} de P-PO_4. No décimo quarto dia, início da fase estacionária a concentração de fósforo nos tratamentos C e D foram significativamente (df=5, F=28,3098, p<0,0001) mais altas que nos outros tratamentos com 43,73±5,16 µmol.L^{-1} e 50,45±15,89 µmol.L^{-1}, enquanto que os outros tratamentos tiveram concentrações de 8,39±2,75 µmol.L^{-1},

10,43±2,3 µmol.L^{-1}, 3,04±0,69 µmol.L^{-1} e 2,76±0,59 µmol.L^{-1} de P-PO_4 para A, B, E e F respectivamente. Os valores finais de fosfato foram mais altos para D com 45, 67±9,54 µmol.L^{-1}, seguido por C com 18,49±4,35 µmol.L^{-1}, F com 9,33±2,86 µmol.L^{-1}, A com 5,49±0,64 µmol.L^{-1}, B com 3,16±2,51 µmol.L^{-1} e E com 3,06±1,65 µmol.L^{-1} de P-PO_4. As diferenças entre os tratamentos foram significativas (df=5, F=38,2354, p<0,0001).

Figura 12- Concentração média de nutrientes (Fosfato, Amônia, Nitrato e Nitrito) em µmol.L^{-1} para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) nos dias 0, 14 e 18.



As concentrações de nitrogênio na forma de nitrito (Fig.11) inicialmente não apresentaram diferenças significativas (df=5, F=1,6721, p>0,05) com concentrações de 0,26±0,115 µmol.L^{-1} N-NO_2 para A, 0,26±0,123 N-NO_2 µmol.L^{-1} para B, 0,07±0,008

$N\text{-}NO_2$ µmol.L^{-1} para C, 0,08±0,007 $N\text{-}NO_2$ µmol.L^{-1} para D, 0,07±0,021 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_2$ para E e 0,24±0,271 µmol.L^{-1} para F. Até atingir a fase estacionária do cultivo a concentração de $N\text{-}NO_2^-$ aumentou nos tratamentos C e D (0,7±0,286 µmol.L^{-1} e 0,47±0,304 µmol.L^{-1}, respectivamente), enquanto que nos outros tratamentos esta concentração diminuiu (A=0,14±0,025 µmol.L^{-1}, B=0,12±0,045 µmol.L^{-1}, E=0,05±0,052 µmol.L^{-1} e F=0,03±0,025 µmol.L^{-1} de $N\text{-}NO_2$). Após o décimo quarto a concentração em B, C e D diminuiu com concentrações de 0,06±0,008, 0.36±0,056 e 0,26±0,094 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_2^-$. As concentrações de nitrito aumentaram para A (0.33±0.182 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_2$) para E (0,08±0 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_2$) e para F (0,1±0,02 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_2$). As diferenças no último dia foram significativas (df=5, F=7,1127, p<0,003).

As concentrações de nitrogênio na forma de nitrato (Fig. 11) iniciais foram mais altas para os tratamentos A e B, 698,53±203,27 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ e 769,28±234,66 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ respectivamente. Em todos os outros tratamentos as concentrações eram abaixo do nível de detecção do método. No décimo quarto dia a concentração de nitrato em A e B era abaixo do detectável pelo método, assim como nos tratamentos D e F, as concentrações em C e E foram 0.93±1,61 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ e 1,67±2,89 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ e não houve diferença significativa entre o tratamentos (df=5, F=0,8299, p>0,5). No último dia do experimento não houve diferenças significativas (df=5, F= 2,8418, p>0,06) entre os tratamentos e as concentrações finais foram 2,10±1,82 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ para A, abaixo do nível de detecção para B, 1,27±1,68 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ para C, 4,81±0,44 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ para D, 0,79±1,37 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ para E e 4,60±4,17 µmol.L^{-1} $N\text{-}NO_3$ para F.

As concentrações de nitrogênio amoniacal (Fig. 11) iniciais foram significativamente (df=5, F=133,7, p<0,001) menores para A (555±37.1 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$) e B (623±50,7 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$). Os outros tratamentos apresentaram concentrações superiores, 4252±369,7, 4121±185,4, 4995±365 e 5362±573,8 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$ para C, D, E e F respectivamente. No décimo quarto dia as concentrações de nitrogênio amoniacal diminuíram para todos os tratamentos. Com concentrações mais baixas para A (209±103,4 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$) e B (286±37 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$), valores intermediários para C (1721±291,2) e D(1744±226,16) e valores mais altos para E (3285±895,1 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$) e F(3311±208,3 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$).No último dia a concentração em A apresentou leve incremento (357±68 µmol.L^{-1} $N\text{-}NH_4$), enquanto

nos outros tratamentos a concentração diminuiu, mas mantendo valore mais baixos para B (226,2±63,15 µmol.L^{-1} N-NH_4), os valores para os outros tratamentos foram 998±52,5 µmol.L^{-1} N-NH_4 para C, 1106±124.5 µmol.L^{-1} N-NH_4 para D, 1949±157,6 µmol.L^{-1} N-NH_4 para E e 2115±59,6 µmol.L^{-1} N-NH_4 para F. As diferenças no final do experimento foram significativas (df=5, F=199,9, p<0,0001) com separação de três grupos de acordo com o teste post-hoc de Tukey, sendo eles A e B, C e D e o terceiro E e F.

4.2.3 Biomassa e densidade celular

Não houve diferenças significativas (df=5, F= 1,59, p>0,2) na densidade celular (Fig.13) inicial média de 0,38±0,7 x 10^7 Céls.mL^{-1}. Apesar de pequenas diferenças no crescimento essas não foram significativas (df=5, F=5,96, p<0,01) até o décimo quarto dia, quando A (9,5±2,34 x 10^7 Céls.mL^{-1}) e B(8,9±0,88 x 10^7 Céls.mL^{-1}) apresentaram densidade de células superior aos tratamentos E(5,5±0,48 x 10^7 Céls.mL^{-1}) e F(5,4±0,65 x 10^7 Céls.mL^{-1}), C e D apresentaram valores intermediários 7,9±0,21 x 10^7 Céls.mL^{-1} e 6,7±0,14 x 10^7 Céls.mL^{-1}, respectivamente. Com a adição de ferro no décimo quarto dia, o tratamento B apresentou uma queda na densidade celular no décimo sexto dia, que chegou a 5,7±1 x 10^7 Céls.mL^{-1}. O tratamento C também apresentou uma pequena queda 7,75±0,73 x 10^7 Céls.mL^{-1}. O tratamento A, por outro lado, atingiu sua máxima densidade no dia 16 do experimento, com 9,7±1,24 x 10^7 Céls.mL^{-1}, assim como E (5,86±1 x 10^7 Céls.mL^{-1}) e F (6,45±1,01 x 10^7 Céls.mL^{-1}), o tratamento D teve densidade celular de 7,55±1,63 x 10^7 Céls.mL^{-1}. As diferenças no décimo sexto dia foram significativas (df=5, F=5,61, p<0,01), principalmente pela diferença entre os tratamentos A e B, E e F. No décimo oitavo dia B, C e D apresentaram um pequeno aumento e atingiram densidade celular nos valores de 7,3±0,61 x 10^7 Céls.mL^{-1}, 8,2±0,78 x 10^7 Céls.mL^{-1}, 7,6±1,55 x 10^7 Céls.mL^{-1}, respectivamente. Os outros tratamentos apresentaram queda na densidade celular, com valores finais de 9,3±1,69 x 10^7 Céls.mL^{-1} para A, 5,5±0,9 x 10^7 Céls.mL^{-1} para E e 5,4±0,25 x 10^7 Céls.mL^{-1} para F. Houve novamente diferença significativa (df=5, F=5,7, p<0,01), especialmente entre o tratamento A e os tratamento E e F que apresentaram densidade celular mais baixa. Para as taxas de crescimento específico (µ(d^{-1})) não houve diferença significativa (Df=5, F=2,013, p=0,149) entre os tratamentos, seus valores são apresentados na Tabela 7. Os valores de µ são superiores quando calculados para o décimo quarto dia.

Figura 13- Densidade celular média e desvio padrão (x10^7 Céls.mL^{-1}) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária), para todo o período do experimento.

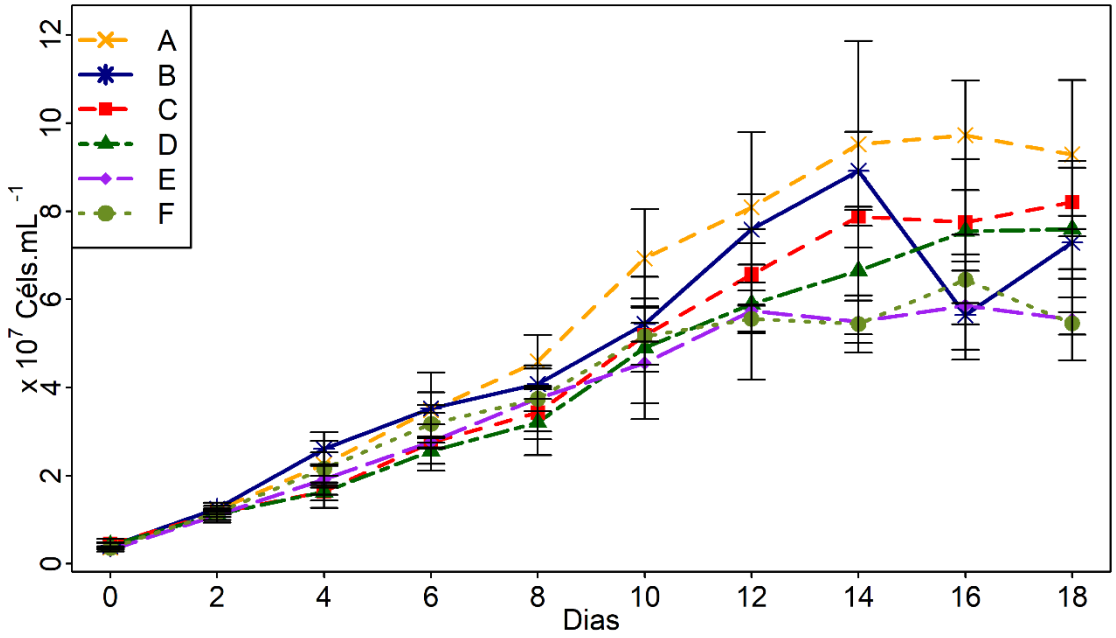


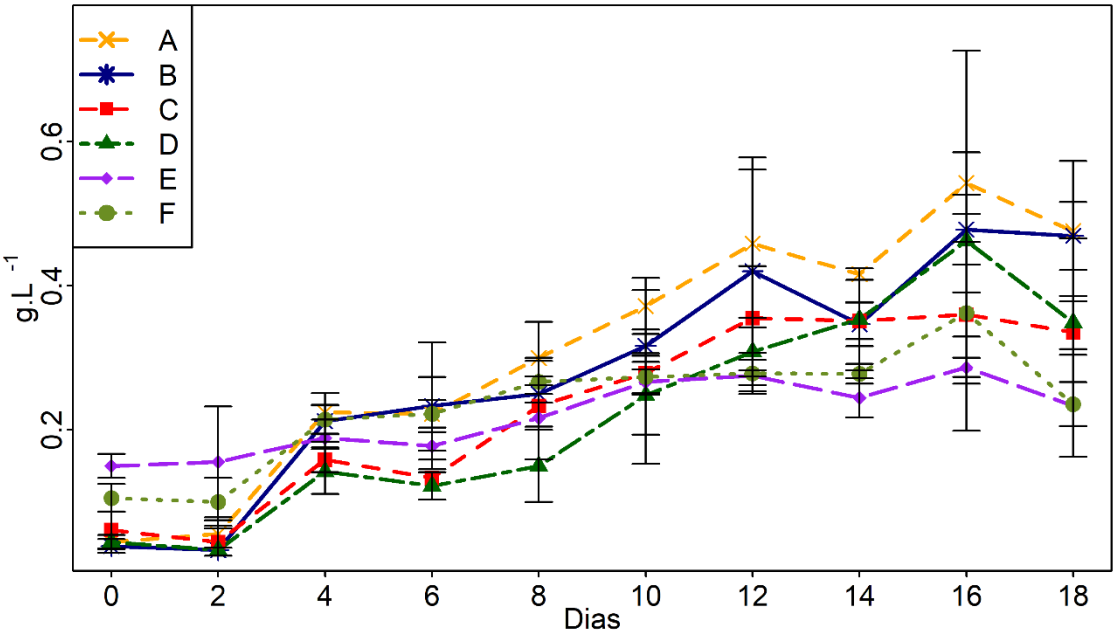
Tabela 8 - Crescimento específico (μ (dia^{-1}), média e desvio padrão, para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C (Meio fertilizante adaptado), D (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária). Calculado para do início ao fim do experimento (18 dias) e do início até a fase estacionária e máxima densidade média (14 dias).

Tempo	18 dias		14 dias	
Tratamento	Média	Desvio	Média	Desvio
A	0,18	0,012	0,23	0,020
B	0,16	0,015	0,22	0,012
C	0,16	0,011	0,21	0,015
D	0,16	0,022	0,20	0,029
E	0,16	0,016	0,20	0,015
F	0,15	0,007	0,19	0,009

Em termos de biomassa (g.L^{-1}) (Fig. 14) houve diferença significativa (df=5, F= 22,68, p>0,2), pois E e F apresentaram maior biomassa, isso provavelmente seria a má diluição do ferro e consequente aumento aparente da biomassa. Os valores iniciais foram 0,04±0,01 g.L^{-1} para o tratamento A, B e D, 0,06±0,025 g.L^{-1} para C, 0,15±0,017 g.L^{-1} e 0,11±0,019 g.L^{-1} para E e F respectivamente. A biomassa aumentou de forma acelerada até o quarto dia, com diferenças significativas (df=5, F=6,08, p<0,005) entre o tratamento A (0,22±0,01 g.L^{-1}) com maior biomassa em relação aos tratamentos C

(0,16±0,017) e D (0,14±0,031). Até o dia 12 todos os tratamentos aumentaram sua biomassa de forma constante e as diferenças não foram significativas estatisticamente (df=5, F=2,43, p>0,09). Os valores observados foram 0,46±0,103 $g.L^{-1}$, 0,42±0,158 $g.L^{-1}$,0,36±0,072 $g.L^{-1}$, 0,31±0,034 $g.L^{-1}$, 0,28±0,022 $g.L^{-1}$, 0,28±0,028 $g.L^{-1}$, para A, B, C, D, E e F respectivamente. Do dia 12 para o dia 14 o tratamento F manteve a mesma biomassa (0,28±0,014 $g.L^{-1}$), o tratamento D apresentou aumento da sua biomassa (0,35±0,071 $g.L^{-1}$), já o restante dos tratamentos apresentaram queda nos valores de biomassa, 0,42±0,008 para A, 0,35±0,031 $g.L^{-1}$ para B, 0,35±0,025 $g.L^{-1}$ para C e 0,24±0,027 $g.L^{-1}$ para E. Houve diferença significativa entre os tratamentos (df=5, F=8,93, p<0,001), onde E foi menor que o restante dos tratamentos, com exceção de F.

Figura 14- Biomassa média e desvio padrão ($g.L^{-1}$) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária), para todo o período do experimento.



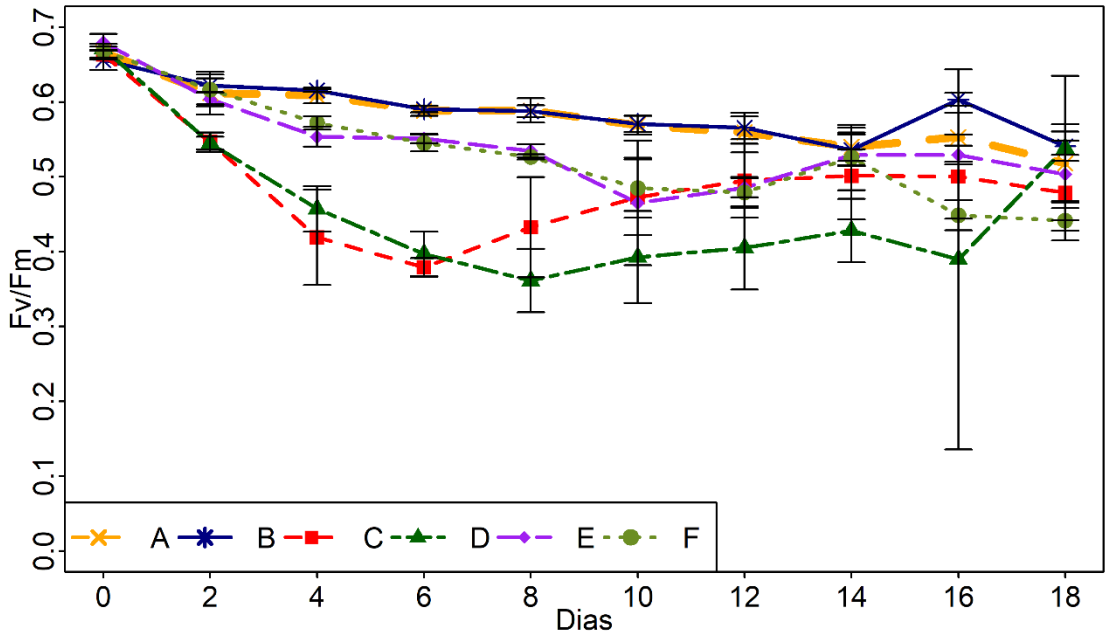
Após a adição do ferro nos tratamentos B, D e F todos apresentaram aumento da biomassa no décimo sexto dia, quando atingiram as máximas biomassas para todo o período do experimento (A=0,54±0,043 $g.L^{-1}$, B=0,48±0,048 $g.L^{-1}$, C=0,36±0,031 $g.L^{-1}$, D=0,46±0,26 $g.L^{-1}$, E=0,29±0,013 $g.L^{-1}$ e F=0,36±0,098 $g.L^{-1}$). A foi significativamente maior que os tratamentos C, D, E e F (df=5, F=8,76, p<0,001). No dia 18 todas a biomassa de todos os tratamentos diminuiu, sendo que A (0,48±0,097

g.L^{-1}) e B (0,47±0,047 g.L^{-1}) foram significativamente (df=5, F=5,7, p<0,01) maiores que E (0,23±0,071 g.L^{-1}) e F(0,24±0,31 g.L^{-1}), com C e D tendo valores intermediários (0,34±0,13 g.L^{-1} e 0,35±0,037 g.L^{-1}, respectivamente).

4.2.4 Estresse fisiológico

A eficiência fotossintética (Fig. 15) (Fv/Fm) não apresentou diferenças significativas (df=5, F=2,21, p>0,1); inicialmente, todos os tratamentos apresentaram valores entre 0,66 e 0,68. A partir do segundo dia diferenças significativas foram observadas (DF=5, F=13,82, p<0,001), com valores mais baixos para C (0,55±0,013) e D (0,55±0,009). Os valores de Fv/Fm para os outros tratamentos foi de 0,61±0,029 para A, 0,62±0,009 para B, 0,6±0,01 para E e 0,62±0,02 para F. No quarto dia a diferença (DF=5, F=22,15, p<0,0001) aumentou, C e D ficaram ainda com valores mais baixos (0,42±0,064 e 0,46±0,03). Entre o restante dos tratamentos não houve diferenças significativas, A (0,61±0,011), B (0,62±0,002), E (0,55±0,13) e F (0,57±0,009). No sexto dia houve uma maior diferenciação entre os tratamentos, com significativas diferenças (df= 5, F=128,1, p<0,0001). A e B apresentaram valores mais altos (0,59±0,007 e 0,59±0,004), E e F valores intermediários (0,55±0,006 e 0,55±0,011), C e D com valores mais baixos (0,38±0,012 e 0,4±0,03). No oitavo dia as diferenças (df=5, F= 22, p<0,0001) continuaram, no entanto só foi significativa para C e D quando comparadas com o restante dos tratamentos. No décimo dia com o aumento dos valores para o tratamento C (0,47±0,05) a diferença foi significativa (df=5, F=5,51, p<0,01) devido aos valores mais baixos apresentados por D (0,39±0,061) em relação aos outros tratamentos, que de acordo com o teste post-hoc de Tukey não eram diferentes. Os valores para os outros tratamentos no dia 10 foram: 0,57±0,013 para A, 0,57±0,011 para B, 0,47±0,083 para E e 0,049±0,04 para F. No décimo segundo dia houve um leve aumento nos valores de Fv/Fm para os tratamentos C (0,49±0,049), D (0,41±0,056), E (0,49±0,013) e F(0,48±0,02). Para A e B os valores não mudaram muito em relação ao décimo dia, 0,56±0,027 e 0,57±0,015, respectivamente. As diferenças foram significativas (df=5, F=8,89, p<0,001) especialmente pela diferença entre o tratamento D com valores mais baixos e os tratamentos A e B.

Figura 15 Eficiência fotossintética potencial (Fv/Fm) média e desvio padrão para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária), para todo o período do experimento.

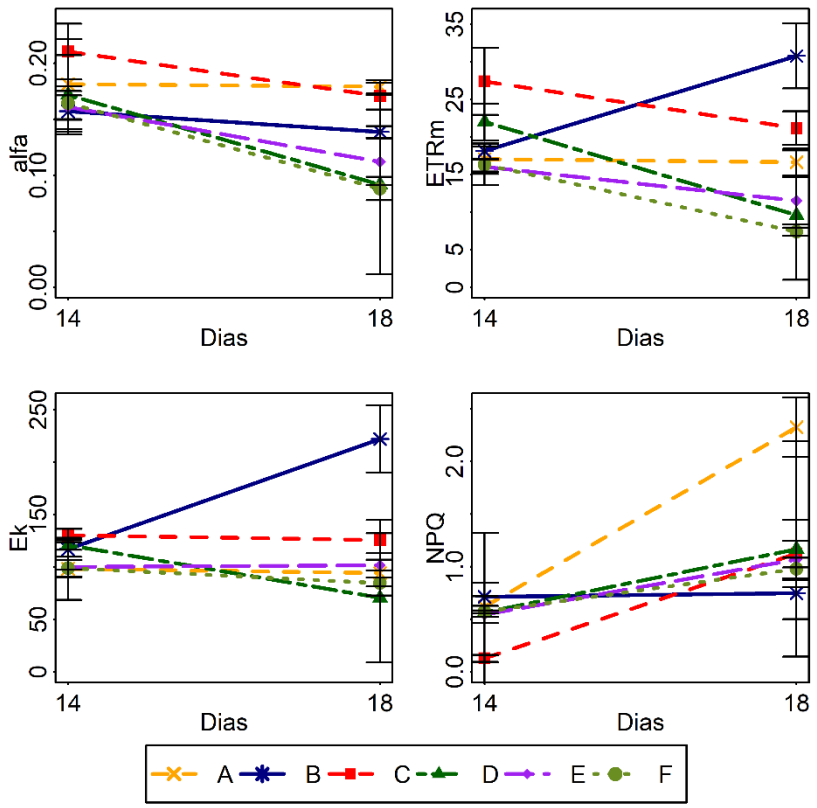


No décimo quarto dia ocorreu uma leve redução nos valores de Fv/Fm dos tratamentos A e B, 0,54±0,026 e 0,54±0,021. Os valores dos outros tratamentos continuaram subindo e apenas D (0,43±0,042) apresentou valor significativamente mais baixo (df=5, F=3,93, p<0,05) que o restante dos tratamentos (C=0,5±0,058, E=0,53±0,008 e F=53±0,043). Após a adição do ferro nos meios B, D e F os valores caíram para D (0,36±0,31) e F (0,45±0,020), sendo que uma das réplicas do tratamento D apresentou valores próximos de 0. Já para B, os valores de Fv/Fm aumentaram, 0,6±0,009. Para A (0,55±033), C (0,5±0,056) e E (0,53±0,013) os valores não se alteraram muito. Houve diferença significativa (df=5, F=6,9, p<0,005), principalmente devido à diferença entre B e F. No último dia do experimento não houve diferença significativa entre os tratamentos (df=5, F=1,49 , p>0,2) com valores de D maiores (0,54±0,096), e uma leve queda em Fv/Fm para todos os outros tratamentos (A=0,52±0,052, B=0,54±0,02, C=0,48±0,05, E=0,50±0,045 e F=0,44±0,017)

Em relação aos parâmetros da curva de luz (Fig. 16) no dia 14 referente ao início da fase estacionária apena houve diferença significativa no ETRm (df=5, F=9,3, p<0,001), com valores mais altos para C(27,38±4,45) e D(22±2,44) do que para o restante dos tratamentos (A=17,06±1,68, B=18,14±1,01, E=16,02±0,96 e

F=16,32±2,73) . Os valores de alfa, sem diferença significativa (df=5, F=1,68, p>0,2), foram 0,18±0,04 para A, 0,16±0,02 para B, 0,21±0,03 para C, 0,17±0,03 para D, 0,16±0,01 para E e 0,16±0,01 para F. Para os valores de Ek, apesar de pequenas diferenças elas não foram significativas (df=5, F=2,29, p>0,1) com valores mais altos para C(130,2±6,53 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) e D(120,92±4,68 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}), seguidos por A (98,16±29,61 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) e B(116,85±19,27 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}), e com valores inferiores E (99,96±9,78 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) e F(98,8±7,91 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}).

Figura 16- Média e desvio padrão para os parâmetros da curva de luz: alfa, ETRm, Ek e NPQ, para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 14 e 18.



No dia 18, referente ao encerramento do experimento, alfa diminuiu para todos os experimentos, com valores significativamente (df=5, F=3,86, p<0,05) mais altos para A (0,179±0,006) e C (0,171±0,012) em relação a D(0,092±0,08), E (0,112±0,021) e F(0,088±0,01), com valor intermediário de B(0,139±0,005). O valor da taxa de transporte de elétrons (ETRm) aumentou apenas para o tratamento B (30,77±4,14) o

qual foi significativamente (df=5, F=12,35, p<0,001) mais alto que o restante dos tratamentos, além disso C(21,17±2,24) foi significativamente mais alto que F(7,37±0,54) que apresentou o valor mais baixo entre os tratamentos. Os valores para A, D e E foram 16,63±1,78, 14,38±3,23 e 11,5±3,12, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para Ek, com valores significativamente mais altos para B (222,05±32,04 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) que teve aumento, enquanto que os outros tratamentos diminuíram (A=94,16±12,67 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, C=125,59±19,14 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, D=105,82±9,54 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, E=101,52±11,5 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} e F=84,71±12,11 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}).

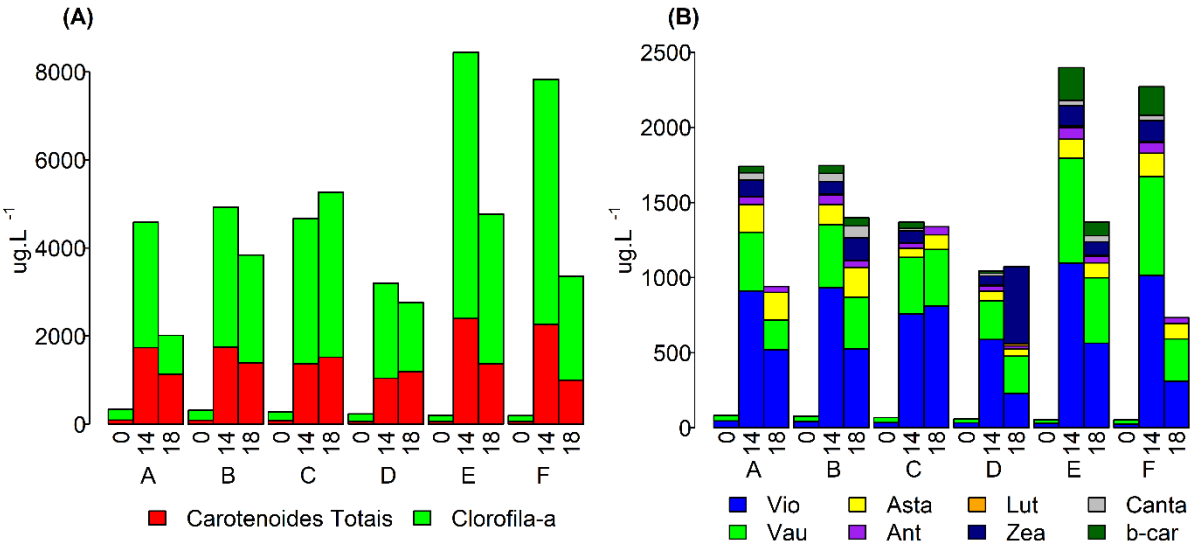
Os valores de dissipação não fotoquímica (NPQ) não foram diferentes significativamente no dia 14 (início da fase estacionária) (df=5, F=1,22 , p>0,35), os valores encontrados foram 0,62±0,097 para A, 0,71±0,13 para B, 0,127±0,034 para C, 0,566±0,755 para D, 0,544±0,082 para E e 0,57±0,012 para F, o alto desvio padrão em D é devido a uma das réplicas que apresentou alto valor de NPQ (D2=1,44) enquanto as duas outras réplicas apresentaram valores menores (0,121 e 0,138 para as outras duas réplicas), desconsiderando o tratamento D a ANOVA indica que existe diferença significativa (df=4, F=22,16 p<0,001) entre os tratamentos com C apresentando valores mais baixos. Acredita-se que a tendência do tratamento D é manter valores semelhantes ao C até o dia 14, visto que a composição desses meios é a mesma até esse ponto, no entanto houve o comportamento anormal de uma das réplicas. Do dia 14 para o dia 18 houve aumento no valor de NPQ para todos os tratamentos, no entanto esse aumento foi menor para B e F que aumentaram 2,5% e 71%, respectivamente, os outros tratamentos apresentaram aumentos superiores (E=102%, A=284%, D=382%, e C=784%). As diferenças nos valores finais de dissipação não fotoquímica (NPQ) foram significativas (df=5, F=4,15, p<0,05) com valores mais alto para o tratamento A (2,32±0,28) em relação a B (0,71±0,24) e F (0,97±0,106). Os tratamentos C (1,124±0,32), D (1,167±1,023) e E (1,068±0,178) apresentaram valores intermediários. Neste caso, uma réplica de D apresentou valores mais baixos (D3).

4.2.5 Perfil pigmentar

A concentração de pigmentos (Fig.17, Tab. 9) no dia 0 não apresentou diferença significativa para carotenoides totais (car) (df=5, F=1,87, p>0,1), clorofila-*a*

(chl-a) (df=5, F=1,87, p>0,1) ou qualquer um dos carotenoides de forma separada, como esperado, pois são oriundos do mesmo inóculo. Inicialmente as concentrações de astaxantina (asta), anteraxantina (ant) e cantaxantina (canta) foram abaixo dos níveis de detecção pelo método. A maior parte dos carotenoides foi composta por violaxantina (vio), seguido por vaucheraxantina e seus ésteres (vau), zeaxantina (zea) e luteína. A razão entre carotenoides totais e clorofila-*a* (car/chl-a) também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (df=5, F=1,9, p>0,1).

Figura 17-Concentração média (ug.L^{-1}) de clorofila-*a* e carotenoides totais (a) e concentração média dos carotenoides: violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18.



Ao atingir a fase estacionária houve diferença significativa para as concentrações de chl-a (df=5, F=10,69, p<0,001) entre os tratamentos sendo que E e F apresentaram as concentrações mais altas. A concentração de carotenoides totais também foi maior nos tratamentos E e F, que foram significativamente diferentes (df=5, F=6,67, p<0,005) de C e D. Os tratamentos A e B tiveram valores intermediários. Não houve diferenças significativas para vio (df=5, F=2,48, p>0,05), que continuou como carotenoide predominante, e asta (df=5, F=2,82, p>0,05). As concentrações de vau foram significativamente (df=5, F=8,42, p<0,002) maiores em E e F, os outros tratamentos tiveram valores mais próximos. Depois de vio e vau, o terceiro carotenoide mais encontrado nas células variou entre os tratamentos, em A e B foi a astaxantina. No entanto para C e D foi a zeaxantina a terceira maior em concentração. Apesar

disso, a zeaxantina apresentou valores significativamente (df=5, F=4,16 e p<0,05) mais altos para E e F, enquanto que A e B apresentaram valores intermediários.

Os tratamentos E e F apresentaram altas concentrações de b-car ao entrar na fase estacionária, valores significativamente (df=5, F=31,38, p<0,0001) mais altos do que no restante dos tratamentos. Em concentrações mais baixas vieram os carotenoides anteraxantina, cantaxantina e luteína. Para anteraxantina (df=5, F=4,31, p<0,05) e luteína (df=5, F=5,23, p<0,01) as concentrações em E e F foram significativamente maiores do que C e D, com valores intermediários para A e B. Já para cantaxantina os valores de A e B foram significativamente (df=5, F=11,38, p<0,0001) mais altos do que C e D. Já para a luteína, que foi o pigmento encontrado em menores concentrações os valores mais altos foram em E e F em relação aos outros tratamentos. Já para car/chl-a houve diferença significativa (df=5, F=11,42, p<0,001) com valores de A maiores do que de C, D, E e F. Enquanto que B foi diferente apenas de C, E e F.

Ao fim do experimento não houve diferenças significativas na concentração de clorofila-a entre os tratamentos (df=5, F=1,37, p>0,1); A apresentou o valor mais baixo, seguido por D, F, B, E e C. Para os carotenoides totais também não houve diferença significativas (df=5, F=0,47, p>0,5). Violaxantina continuou sendo o carotenoide encontrado em maior proporção, sem diferenças significativas entre os tratamentos (df=5, F=0,92, p>0,5). Em seguida veio vaucheraxantina e seus ésteres que também não apresentaram diferença significativa (df=5, F=0,65, p>0,5). As concentrações de astaxantina foram significativamente (df=5, F=5,61, p<0,05) mais altas em A e B do que nos outros tratamentos.

Para A, B e E astaxantina foi o carotenoide em maior concentração após vio e vau, para C, D e F foi zeaxantina, que apesar de não ter diferença significativa estatisticamente (df=5, F=1,51, p>0,1) teve valores mais altos para D; os tratamentos F, B e C vêm em seguida, e E e A apresentaram valores menores. Para betacaroteno não houve diferença significativa (df=5, F=0,85, p>0,5). Assim como para cantaxantina (df=5, F=3,79, p>0,05), onde A e B apresentaram valores mais altos, seguidos por E e F e com valores mais baixos C e D. As concentrações de anteraxantina diminuíram em relação ao início da fase estacionária e não houve diferença significativa entre os tratamentos (df=5, F=0,73, p>0,5). Para a luteína as diferenças encontradas foram

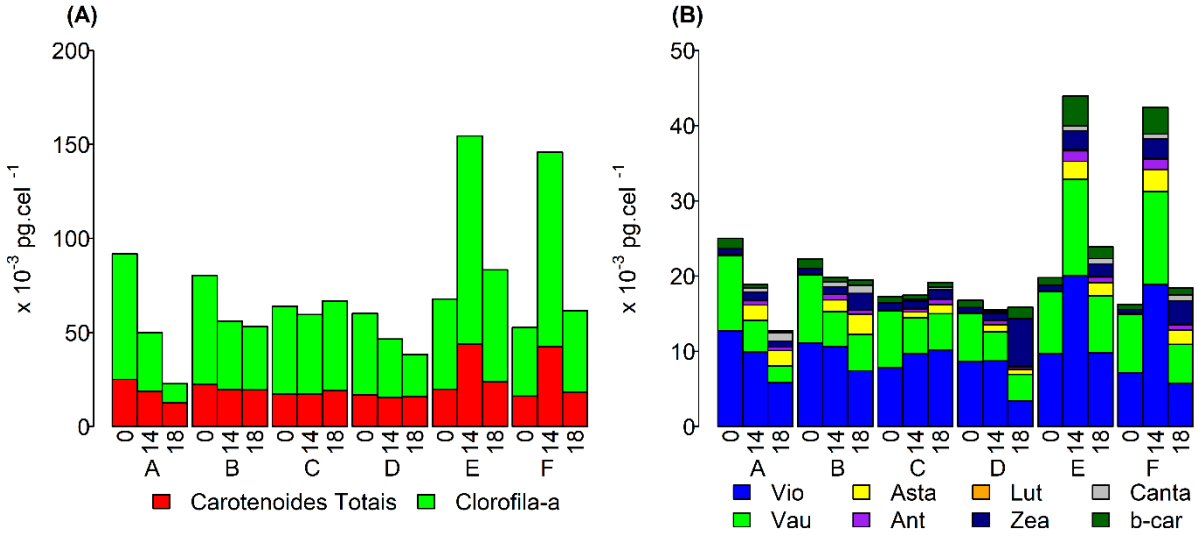
significativas (df=5, F=32,33, p<0,001) com valores maiores para o tratamento D, em relação aos outros tratamentos. Com exceção do tratamento D as concentrações de luteína diminuíram em relação ao início da fase estacionária. Para car/chl-a não houve diferença significativa (df=5, F=1,7, p>0,2). Todos os tratamentos demonstraram uma tendência de aumento da proporção de carotenoides em relação à clorofila-a.

Tabela 9- Concentração média (N=3) e desvio padrão (µg.L^{-1}) de clorofila-a (chl-a) e dos carotenoides (car): violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18.

Pigmentos (µg.cel^{-1})	Dia	0						14						18					
	Tratamento	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
vio	Média	46.5	43.5	34.9	33.2	29.4	26	911.6	934.9	758.8	587.4	1094	1013	520.1	526	809.1	230.2	564.1	309
	Desvio	8.24	4.09	7.83	18.2	18.5	6.01	74.35	130.2	313.6	188.4	18.71	90.77	136.6	410.1	352.6	158.2	273.8	86.87
vau	Média	36.7	35.2	33.5	25.1	25.1	28	389.7	416	375.9	259.6	699.6	660.8	198.5	345.1	377.7	246.7	434.7	282.5
	Desvio	8.43	5	3.75	9.72	9.79	4.85	58.06	60.57	193.3	60.29	39.7	58.81	35.65	130.2	201.9	72.11	204.8	42.4
ante	Média							51.62	64.85	33.51	36.64	77.63	73.1	40.64	43.25	53.6	21.78	45.04	39.28
	Desvio							3.14	14.02	16.07	28.64	13.14	9.78	10.76	12.96	30.01	15.82	26.41	9.06
lut	Média	0.34	0.4	0.33	0.38	0.36	0.28	2.55	5.13	3.85	2.7	9.1	7.64	1.43	3.92	3.81	13.48	4.29	3.5
	Desvio	0.03	0.02	0.02	0.22	0.23	0.06	0.27	2.96	2.64	1.64	0.75	1.52	0.84	2.48	2.2	10.44	1.72	2.03
zea	Média	2.95	2.94	4.02	2.69	2.28	1.97	107.5	82.9	79.78	63.19	136.6	137.1	72.93	148	106	513.6	90.76	172.2
	Desvio	0.73	0.42	0.95	1.65	1.66	0.81	30.29	9.44	37.05	31.81	5.16	13.59	15.31	88.52	48.46	370.5	22.82	53.48
canta	Média							50.08	54.1	15.92	16.39	34.27	34.68	99.24	80.15	22.15	8.44	40.49	40.3
	Desvio							10.68	9.29	5.01	7.06	6.37	6.87	12.58	40.13	4.54	4.87	20.25	21.81
asta	Média							184.5	135.3	59.24	62.26	126.8	153.9	182.3	197.6	97.64	46.94	99.39	102.5
	Desvio							19.64	54.26	6.87	31.83	49.98	76.53	22.58	3.54	37.84	18.44	49.12	55.07
b-car	Média	5.09	4.97	3.87	3.81	3.11	2.44	41.78	52.11	41.8	16.22	218	190.4	22.15	53.64	51.74	118.3	92.41	51.54
	Desvio	0.66	0.38	0.54	2.14	1.72	0.38	7.17	20.75	41.16	10.48	25.08	29.52	11.24	16.52	49.76	170.8	56.98	3.96
chl-a	Média	244	226	204	166	145	133	2844	3177	3304	2154	6051	5563	879.7	2444	3752	1565	3403	2358
	Desvio	49.5	23.9	29.9	105	106	45.1	153.8	678.6	1590	1076	138.3	172.6	690.3	978.2	1951	1046	1534	45.64
total	Média	91.7	87.5	76.8	65.2	60.4	58.7	1739	1745	1369	1044	2397	2270	1137	1398	1520	1194	1371	999.6
	Desvio	15.8	3.28	12.4	31.4	32.1	11.8	144.5	161.7	605.3	357.8	70.56	225.9	236.4	568.8	654.9	207.5	629	155.5
car/chl-a	Média	0.38	0.39	0.38	0.46	0.46	0.46	0.61	0.56	0.42	0.53	0.4	0.41	1.86	0.57	0.42	1.57	0.4	0.42
	Desvio	0.01	0.03	0.02	0.15	0.09	0.06	0.07	0.07	0.03	0.14	0.02	0.03	1.32	0.11	0.03	1.82	0.02	0.06

Quando analisada a concentração dos pigmentos em picogramas por célula (x 10^{-3} pg.cel^{-1}) (Fig. 18, Tab. 10) inicialmente não se tem diferenças significativas entre os tratamentos para nenhum dos pigmentos. As concentrações de violaxantina encontradas no início do experimento foram um pouco mais altas para A e B, do que para os outros tratamentos.

Figura 18- Concentração média de pigmentos por célula em picogramas por célula (x10^{-3} pg.cel^{-1}) de clorofila-a e carotenoides totais (a) e concentração média dos carotenoides (b): violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18.



Ao atingir a fase estacionária, para os tratamentos A e B, as concentrações de carotenoides totais e clorofila-a diminuíram por célula, enquanto que para E e F aumentaram e para C e D não diminui de forma significativa. A clorofila-a foi significativamente (df=5, F=24,29,p<0,001) mais alta em E e F, enquanto que entre os outros tratamentos não houve diferença. A concentração de carotenoides totais por célula também foi significativamente (df=5, F= 14,95, p<0,001) mais alta para E e F em relação aos demais tratamentos. Entre os carotenoides, E e F só não apresentaram concentração significativamente superior de astaxantina em relação aos outros (df=5, F=2,59, p>0,05). As concentrações de aumentaram bastante para E e F que foram significativamente maiores (df=5, F=9,32, p<0,001) do que os demais tratamentos. As concentrações de vau diminuíram em A, B, C e D mas aumentaram em E e F, com diferença significativa estatisticamente (df=5, F=19,66, p<0,001). As concentrações de luteína e beta-caroteno também diminuíram nos tratamentos A, B,

C e D, e aumentaram em E e F. Com E e F apresentando concentrações por célula significativamente (lut – df=5, F= 12,04, p<0,001, b-car- df=5, F=49,59, p<0,001) maiores do que nos outros tratamentos.

A concentração de zeaxantina aumentou em todos os tratamentos, com valores significativamente (df=5, F= 21,17, p<0,001) mais altos para E e F; os outros tratamentos não foram diferentes entre si. As concentrações de astaxantina não foram significativamente diferentes entre os tratamentos (df=5, F= 2,59, p>0,05), apesar de valores médios maior para E e F, seguidos por A e Be com valores menores em C e D. Para cantaxantina os valores encontrados em C e D são significativamente (df=5, F=8,84, p<0,005) inferiores aos tratamentos E e F, enquanto que A e B apresentaram valores intermediários. Para anteraxantina novamente houve diferença significativa para E e F, com valores superiores a A, B, C e D. Ao final do experimento foi observada a queda nos valores de clorofila-a e carotenoides totais para todos os tratamentos com exceção do tratamento C que apresentou um leve aumento. Em relação aos carotenoides totais não houve diferença significativa (df=5, F=0,93, p>0,1) entre os tratamentos. A concentração de clorofila-a foi significativamente (df=5, F=3,12, p<0,05) mais alta para o tratamento E do que no tratamento A. Não houve diferença entre os demais tratamentos. Para os carotenoides majoritários, violaxantina e vaucheraxantina e seus ésteres não houve diferença (df=5, F=1,28, p>0,1 para vio e df=5, F=2,41, p>0,05 para vau) entre os tratamentos, com queda nas concentrações em todos, exceto em C. As concentrações de b-car também diminuíram para todos os tratamentos, e não teve diferença significativa entre eles (df=5, F=0,93, p>0,1).

As concentrações de zeaxantina diminuíram apenas para os tratamentos A e E, A apresentou diferença significativa (df=5, F=3,63, p<0,05) de D que teve incremento nas concentrações celulares de zeaxantina, os tratamentos B, C e F também apresentaram acúmulo de zeaxantina do início da fase estacionária para o fim do experimento. Os tratamentos B e C demonstraram aumento nas concentrações de astaxantina também. Os tratamentos D, E e F tiveram uma queda na concentração de astaxantina, enquanto que A não apresentou muita mudança. A concentração de astaxantina em B foi significativamente diferente (df=5, F=4,43, p<0,05) da concentração de D. O tratamento C apresentou pequeno acúmulo de anteraxantina, enquanto que o restante dos tratamentos apresentou queda na concentração de anteraxantina, sem diferenças significativas entre eles. Todos os tratamentos, com

exceção de D apresentaram queda nas concentrações de luteína, no entanto a diferença entre eles não foi significante (df=5, F=1,98, p>0,1). Já para a cantaxantina o oposto ocorreu, com redução na concentração deste pigmento em D e aumento nos outros tratamentos, de forma que A e B apresentaram valores significativamente maiores (df=5, F=5,35, p<0,01), os outros tratamentos apresentaram valores intermediários.

Tabela 10 - Concentração média e desvio padrão de pigmentos por célula em picogramas por célula ($x10^{-3}$ $pg.cel^{-1}$) de clorofila-a(chl-a) e dos carotenoides: violaxantina (vio), vaucheraxantina (vau), astaxantina(asta), anteraxantina(ant), luteína(lut), zeaxantina (zea), cantaxantina (canta) e betacaroteno (b-car), para os seis tratamentos A (Meio Conway), B (Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C(Meio fertilizante adaptado), D(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F(Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) para os dias 0, 14 e 18.

Pigmentos ($X10^{-3}$ $pg.cel^{-1}$)	Dia	0						14						18					
	Trat	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
vio	Média	12.70	11.07	7.83	8.64	9.71	7.19	9.93	10.64	9.67	8.73	20.04	18.90	5.87	7.43	10.21	3.45	9.81	5.72
	Desvio	2.82	2.26	1.96	5.54	6.69	1.50	2.41	2.40	4.19	1.54	2.15	3.68	2.28	5.85	5.56	3.10	3.34	1.89
vau	Média	10.04	9.13	7.57	6.41	8.21	7.77	4.20	4.67	4.80	3.91	12.82	12.33	2.22	4.78	4.80	3.50	7.57	5.21
	Desvio	2.74	3.09	1.55	3.31	3.83	1.55	0.89	0.60	2.57	0.45	1.67	2.39	0.70	1.85	3.08	1.88	2.47	0.98
ante	Média							0.57	0.74	0.43	0.52	1.41	1.35	0.45	0.59	0.68	0.28	0.77	0.73
	Desvio							0.15	0.22	0.21	0.38	0.13	0.20	0.17	0.14	0.45	0.18	0.34	0.19
lut	Média	0.09	0.10	0.08	0.07	0.08	0.08	0.03	0.06	0.05	0.04	0.17	0.14	0.01	0.06	0.03	0.20	0.08	0.04
	Desvio	0.00	0.02	0.02	0.06	0.08	0.02	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.04	0.01	0.04	0.03	0.20	0.02	0.04
zea	Média	0.80	0.74	0.95	0.70	0.75	0.54	1.12	0.94	1.02	0.92	2.50	2.52	0.82	2.11	1.34	6.25	1.65	3.13
	Desvio	0.22	0.08	0.39	0.46	0.59	0.21	0.06	0.19	0.49	0.36	0.29	0.12	0.28	1.44	0.75	3.97	0.42	0.85
canta	Média							0.53	0.60	0.20	0.24	0.63	0.65	1.10	1.08	0.27	0.05	0.72	0.75
	Desvio							0.08	0.06	0.06	0.07	0.17	0.19	0.29	0.47	0.05	0.08	0.34	0.43
asta	Média							2.04	1.55	0.75	0.90	2.37	2.96	2.02	2.72	1.18	0.64	1.73	1.90
	Desvio							0.63	0.69	0.10	0.36	1.15	1.66	0.49	0.21	0.38	0.28	0.68	1.06
b-car	Média	1.38	1.26	0.87	0.99	1.02	0.67	0.47	0.60	0.54	0.23	3.96	3.55	0.26	0.74	0.68	1.47	1.58	0.94
	Desvio	0.21	0.18	0.19	0.63	0.63	0.09	0.17	0.28	0.54	0.13	0.15	0.79	0.15	0.23	0.71	2.01	0.81	0.03
chl-a	Média	66.71	57.98	46.56	43.41	48.01	36.51	31.23	0.90	42.13	31.07	110.51	103.31	0.05	33.76	47.59	22.59	59.39	43.31
	Desvio	16.75	15.60	12.79	30.72	37.50	11.40	8.31	10.80	21.11	11.71	7.37	14.53	8.88	13.40	29.89	17.97	18.96	2.44
total	Média	25.04	22.40	17.37	16.83	19.84	16.25	18.88	19.80	17.46	15.50	43.91	42.40	12.75	19.51	19.18	15.85	23.91	18.42
	Desvio	5.52	5.29	4.08	9.89	11.85	3.21	4.20	3.60	8.08	3.23	5.14	8.64	4.33	8.63	10.35	1.50	7.52	3.56

4.2.6 Perfil de ácidos graxos

Entre os ácidos graxos analisados ao final do experimento predominou a presença dos ácidos palmítico e palmitoleico (C16:0 e C16:1), além da presença de C14:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:4 n-6 e o ácido eicosapentaenoico C20:5 n-3. Houve diferença significativa (df=5, F=32, p<0,001) na porcentagem de C14:0 em relação ao total de ácidos graxos, com valores mais altos para E (6,48±0,66%) e F (7,49±1,46%) do que nos outros tratamentos. Na porcentagem de C18:1 também houve diferenças significativas (df=5, F=7,1, p<0,01) com valores mais baixos para E (14,47±1,94%) e F (12,13±2,37%) em relação ao tratamento C (25,6±3,34%). Nos outros tratamentos não houve diferenças significativas e os valores são apresentados na tabela 8. A concentração total de ácidos graxos (mg.g^{-1} PS), foi baixa para todas as réplicas com exceção de 3 réplicas que apresentaram valores mais altos essas réplicas foram a A1(251,97 mg.g^{-1} PS) , a C2 (137,87 mg.g^{-1} PS) e a D3(123,43 mg.g^{-1} PS). Entre a porcentagem total de SFA + MUFA não houve diferença significativa entre os tratamentos, assim como a porcentagem total de PUFA que também não foi significativamente diferente entre os tratamentos.

Tabela 11 - Perfil dos ácidos graxos (% de ácidos graxos totais), concentração de ácidos graxos (mg.g^{-1}) e porcentagem do total de ácidos graxos saturados (SFA) somados ao total de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), e porcentagem do total de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) para os seis tratamentos A (Meio Conway), B(Meio Conway com adição de ferro na fase estacionária), C (Meio fertilizante adaptado), D (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro na fase estacionária), E (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo) e F (Meio fertilizante adaptado com adição de ferro no início do cultivo e na fase estacionária) no último dia de experimento (dia 18).

Tratamentos	A		B		C		D		E		F	
Ác. Graxos	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
C14:0	3.39	0.22	3.66	0.29	3.25	0.51	3.48	0.34	6.48	0.66	7.49	1.46
C16:0	34.39	1.42	30.88	2.03	28.99	2.57	31.01	3.24	30.86	5.48	40.61	9.66
C16:1	25.91	3.15	26.11	1.24	26.34	1.22	26.96	0.75	27.80	1.41	23.77	8.06
C18:0	2.48	0.87	2.55	0.29	1.71	0.36	0.68	0.18	2.46	0.92	2.37	1.14
C18:1	22.94	3.35	22.57	3.17	25.60	3.34	25.23	0.78	14.47	1.94	12.13	3.78
C18:2	2.27	0.45	3.13	0.69	3.54	1.57	2.89	1.01	3.88	0.91	2.41	0.49
C20:4	1.39	0.38	2.10	0.47	1.90	0.76	2.36	0.70	1.87	0.71	1.79	0.44
C20:5	5.02	1.97	6.11	3.85	4.55	4.60	7.92		7.85	4.30	4.46	1.95
Outros	2.19	0.55	4.93	3.11	4.13	3.03	4.75	2.56	4.33	0.35	5.57	2.65
Total (mg.g^{-1} PS)	84,92	144,62	2.04	1.37	48.05	77.79	44.50	68.36	2.12	1.45	2.70	1.46
%SFA+MUFA	91.32	2.48	90k.41	5.31	89.78	6.46	91.59	6.45	86.18	5.72	91.55	2.88
%PUFA	8.68	2.48	9.39	5.40	10.14	6.35	8.28	6.34	13.61	6.05	8.45	2.88

5 DISCUSSÃO

O aumento excessivo de salinidade no experimento 1 foi resultante da temperatura da sala, visto que a redução de 25°C para 20°C amenizou esse problema. O comportamento do pH observado para ambos os experimentos foi o esperado, visto que o uso de íon amônio como nutriente, assim como a adição de $FeCl_3$ tendem a reduzir o pH da água, pois ocorre a hidrólise do íon Fe^{3+} e a assimilação do nitrogênio oriundo de NH_4^+ pelas microalgas, ambos os processos com liberação de íons de hidrogênio (H^+), ao contrário da assimilação de nitrogênio oriundo do nitrito e nitrato, que leva à liberação de OH^- e aumenta o pH do meio (MAYERS; FLYNN; SHIELDS, 2014).

A biomassa gerada ao final primeiro experimento foi alta quando comparada a outros estudos com *Nannochloropsis oculata,* que tem valores entre 0,5 $g.L^{-1}$ e 1,2 $g.L^{-1}$ (SU et al., 2011; ZHU; DUNFORD, 2013; ARRIADA; ABREU, 2014; MARTÍNEZ-ROLDÁN et al., 2014), e mesmo quando comparada ao segundo experimento, apesar de o número de células não ser diferente entre eles. Isso pode ter sido gerado por um maior acúmulo de substâncias de reserva, devido ao tempo mais prolongado em condições de estresse. Além disso, as células do primeiro experimento tiveram o estresse adicional do aumento de salinidade, o que pode também ter interferido no perfil de pigmentos, já que a salinidade tem efeito prejudicial na concentração de clorofila-*a* e no crescimento celular (GU et al., 2012; MARTÍNEZ-ROLDÁN et al., 2014). O crescimento específico foi acima do encontrado por alguns autores (CONVERTI et al., 2009; ARRIADA; ABREU, 2014), que observaram cerca de 0,13 $dia^{-1.}$ O número de células também foi superior ao encontrado em outros estudos (SUKENIK; ZMORA; CARMELI, 1993; ARRIADA; ABREU, 2014), que apresentam valores entre 1 e 2 $x10^7 cels.mL^{-1}$.

O perfil de pigmentos encontrados para ambos os experimentos condiz com o descrito na literatura (ANTIA; CHENG, 1982; VOLKMAN et al., 1993; LUBIÁN et al., 2000; SOLOVCHENKO et al., 2014), com predominância da clorofila-*a* e, entre os carotenoides, maiores quantidades de violaxantina e vaucheraxantina, e em menores quantidades astaxantina, zeaxantina, beta-caroteno, anteraxantina, cantaxantina e luteína. No primeiro experimento, a presença desde o início de astaxantina e cantaxantina indica que o cultivo foi iniciado com uma densidade muito alta e que o

inóculo já estava relativamente estressado, já que esses pigmentos são característicos de culturas mais velhas (ANTIA; CHENG, 1982). Com a redução da densidade de células inicial no experimento dois, estes pigmentos não foram detectados.

A depleção de nutrientes no primeiro experimento ocorreu rapidamente, do primeiro para o segundo dia e, com exceção dos meios DF e AX, chegaram próximo a zero em suas concentrações. A deficiência nutricional para o número de células inoculadas reduziu as concentrações de clorofila-*a* enquanto que as concentrações de carotenoides foram mais estáveis. Esse comportamento é resultado principalmente da depleção de nitrogênio (VAN VOOREN et al., 2012). Visivelmente a maior redução de pigmentos no geral foi para o tratamento Conway; isso pode ter sido causado por uma maior deficiência, visto que a disponibilidade de nitrogênio nesse meio era menor do que no restante. Esse mesmo fator é o que possivelmente gerou um grande acumulo de astaxantina neste meio ao final do experimento (OROSA et al., 2000). Após o quarto dia é visível uma estabilização do cultivo, com aumento nas concentrações de clorofila-*a* e carotenoides totais. Houve também amadurecimento do cultivo, no entanto sob condições de estresse nutricional, que reflete nas maiores concentrações de ketocarotenóides (e.g. Astaxantina, Cantaxantina). Outra possibilidade para o aumento nas concentrações desses pigmentos é o aumento da intensidade luminosa devido a redução do volume no erlenmeyer, que gera maior superfície de contato do cultivo com a luz (LUBIÁN et al., 2000; SOLOVCHENKO et al., 2014). Para o tratamento DF a concentração de clorofila-*a* diminuiu; neste caso é possível afirmar que o decréscimo da clorofila-*a* está relacionado com a depleção do nitrogênio. A hipótese da depleção do nitrogênio é a mais plausível, visto que o tratamento AX, que continha o dobro de amônia, foi o tratamento que teve melhor desempenho na produção de carotenoides e de clorofila-*a*, apesar de não ser considerado significativo pelas estatísticas. A falta de nitrogênio gera degradação das clorofilas e estruturas associadas como forma de desvio energético (LI et al., 2014). A maior estabilidade no perfil de pigmentos entre o oitavo e o décimo dia para o meio Conway pode ser devido a utilização dos metais traços presentes no meio e que tem a capacidade de manter o aparato fotossintetizante funcionando de forma mais adequada (RAVEN; EVANS; KORB, 1999; CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2013). O meio Conway apresentou também do oitavo para o decimo dia um aumento nas

concentrações de cantaxantina, indicando um amadurecimento do cultivo, enquanto os outros tratamentos apresentaram redução desse pigmento, o que corrobora a ideia de que a mortandade de células estava elevada nesses tratamentos (ANTIA; CHENG, 1982; LUBIÁN et al., 2000).

O uso do meio AX visando à produção de carotenoides e mesmo de clorofila-*a* para fins comerciais se mostrou eficiente, visto que ele foi o que produziu a maior quantidade desses compostos por litro de meio. Associado a isto está o baixo custo do meio de cultivo para gerar produtos de alto valor agregado, como carotenoides, com alta porcentagem de astaxantina. A assimilação de nitrogênio amoniacal resulta em maior consumo de oxigênio na mitocôndria do que o uso de outras fontes de nitrogênio. Com isso o estresse oxidativo na célula aumenta e consequentemente se tem uma maior produção de carotenoides antioxidantes como medida de proteção (COLLOS, 1998), tais como os keto-carotenoides astaxantina e cantaxantina(LOHR, 2011). Violaxantina e possivelmente vaucheraxantina estão associadas à captação de luz (fotocoletores). Apesar de estar presente em outras microalgas, apenas em *Nannochloropsis* a violaxantina é encontrada em altas concentrações, representando até 70% do total de carotenoides (OWENS; GALLAGHER; ALBERTE, 1987). Este carotenoide possui propriedades medicinais, principalmente como possível fonte de tratamento alternativo contra o câncer de mama (PASQUET et al., 2011).

O segundo experimento foi delineado de acordo com os resultados obtidos no primeiro experimento. Foram utilizadas condições iniciais diferentes para melhor avaliar a importância do ferro para o cultivo com meios de baixo custo. As principais mudanças foram a menor densidade celular inicial (de $1x10^7$ céls.mL^{-1} no experimento 1 para $4x10^6$ céls.mL^{-1} no experimento 2)l a temperatura da sala de cultivo mais baixa (20°C ao invés de 25°C), que geraram um maior tempo de crescimento na fase exponencial e menor aumento de salinidade dos meios. Além disso, o meio AX que apresentou bom desempenho no primeiro experimento foi utilizado como base para os meios do experimento 2. Em vez de utilizar duas vezes a quantidade de íons de amônio do meio com fertilizantes original, foi utilizado o meio com 1,5 vezes a concentração de íons de amônio, essa mudança foi feita com base na tentativa de impedir que o pH diminuísse demasiado, já que também haveria a adição do $FeCl_3$ que contribui para a queda do pH.

No segundo experimento, com uma densidade inicial menor, o cultivo aparentemente apresentou uma fase *lag* até o segundo dia quando começou o crescimento exponencial até o décimo quarto dia, aproximadamente, e depois entrou na fase estacionária; no dia 18 os cultivos já estavam começando a diminuir a densidade celular, indicando uma fase de decaimento. Nesse segundo experimento, no entanto, houve diferença significativa tanto nas densidades celulares como na biomassa, com valores maiores observados para os tratamentos com meio Conway. Para esses tratamentos também foram observadas melhores condições de Fv/Fm, próximos a 0,6 indicando um bom estado fisiológico (WHITE; ANANDRAJ; BUX, 2011; KANDILIAN et al., 2014). Em termos de crescimento específico não houve diferença entre todos os tratamentos, portanto, não foi possível verificar um aumento no crescimento do número de células e na biomassa de *Nannochloropsis oculata* nos meios com adição de ferro, tanto no início do tratamento como no final do tratamento.

Quanto aos aspectos nutricionais é interessante observar a liberação de nitrito nos tratamentos com a ausência de ferro (C e D), indicio da necessidade de ferro no meio. O mesmo efeito pode ser observado entre A e B, onde após o dia 14 ocorre um aumento das concentrações de nitrito em A, mas não em B, que teve adição de ferro extra no dia 14 (COLLOS, 1998). A diferença de fósforo entre os tratamentos E e F e o restante é estranha visto que foram feitos no mesmo *carboy* que C e D, sendo que apenas a solução de cloreto de ferro foi adicionada depois. Existe a possibilidade de que, com a adição do cloreto de ferro, tenham sido formados flocos de hidroxidos de ferro e o fósforo tenha se agregado a essas particulas, sendo liberado ao decorrer do tempo no meio (BARSANTI; GUALTIERI, 2014). Valores de pH mais elevados favorecem a floculação dos cultivos de *N. oculata* (SALES; ABREU, 2014). A ocorrência da formação de aglomerados no tratamento B após a adição da solução de ferro e EDTA não foi observada nos tratamentos D e F provavelmente devido ao pH menor.

A adição de ferro nos meios de baixo custo também promoveu melhoras nas condições fisiológicas dos cultivos, que foram próximas do cultivo com meio Conway. Os valores mais baixos de eficiência fotossintética (Fv/Fm) observados para os tratamentos C e D já no segundo dia indicam uma deficiência nutricional, que neste caso, pode ser atribuída ao ferro. A falta de ferro compromete a capacidade de transporte de elétrons e a captação de luz, por ser componente essencial de diversos

processos na fotossíntese. Os valores de Fv/Fm diminuíram acompanhando a redução dos nutrientes, em especial o nitrogênio para os outros tratamentos. A adição de ferro ao chegar na fase estacionária gerou aumento nos valores Fv/Fm em B e D, melhorando, portanto, o estado fisiológico, no entanto em F, a adição de ferro reduziu o valor da eficiência fotossintética potencial, pois provavelmente o fotossistema II já estava além do ponto de recuperação. A deficiência em ferro e em nitrogênio geram impactos na capacidade do sistema fotossintetizante, sendo que o ferro atua principalmente nas enzimas do sistema antena. A deficiência de ferro pode muitas vezes levar à redução da concentração de pigmentos e é mais drástica na clorofila-*a* (YOUNG; BEARDALL, 2005) . O estresse gera aumento em NPQ pela redução na capacidade de transporte de elétrons (ETRm), dessa forma forçando as células a dissipar a energia excessiva na forma de calor. Valores baixos de Fv/Fm sugerem danos estruturais no PSII que pode ser gerado por desequilíbrios no transporte de elétrons afetando a produção de ATP e consequentemente de proteínas importantes para a manutenção do aparato fotossintetizante. Os valores de NPQ costumam voltar ao normal após indução de estresse indicando um equilíbrio devido à fotoadaptação (MARTÍNEZ-ROLDÁN et al., 2014)

Os valores da taxa de transporte de elétrons foram maiores para os tratamentos sem adição de ferro no dia 14, para B o ETRm aumentou depois da adição de ferro na fase estacionária, e F foi o que teve menor valor. Alfa foi entre 0,16 e 0,21 inicialmente e diminuiu para todos os tratamentos, mas com menos intensidade para A. Os valores de Ek, que indicam a incidência mínima de saturação, foram baixos no dia 14, e, portanto, todos os tratamentos estavam sob estresse luminoso, com valores entre 100 e 130. No dia 18 apenas B teve valores de Ek superiores, enquanto o restante não mudou. Possivelmente a adição do ferro trouxe melhoras para a captação de luz deste tratamento, principalmente pelo aumento de clorofila-*a*. O ferro é quantitativamente o metal traço de maior importância envolvido nas reações em organismos fotossintetizantes, pois está presente em diferentes etapas da cadeia de elétrons. A deficiência de ferro diminui as concentrações de clorofila-a e prejudica a manutenção dos fotossistemas I e II (RAVEN; EVANS; KORB, 1999). O fato de no dia 14 os tratamentos com ferro apresentarem ETRm mais baixos e NPQ mais altos do que os tratamentos sem ferro indica que esses tratamentos estavam passando por uma forma de estresse, de acordo com a análise de nutrientes ambos os tratamentos

apresentavam baixas concentrações de fosfato, esta informação é coerente com a maior produção de betacaroteno e zeaxantina (FORJÁN et al., 2007).

Com a adição de ferro nos meios é interessante ressaltar a maior produtividade de zeaxantina, com valores que chegaram a 500 $\mu g.L^{-1}$, representando grande parte dos carotenoides no tratamento D, que também teve aumento na luteína. De certa forma a adição de ferro favoreceu o aumento desses pigmentos no cultivo. A adição de ferro trouxe benefícios para as células que tiveram suas concentrações de clorofila-a e carotenoides aumentadas nos tratamentos E e F. Quando microalgas sofrem depleção de nutrientes, o fluxo de elétrons do fotossistema para a cadeia de transporte de elétrons se desregula e espécies reativas de oxigênio se formam. O enfraquecimento dos fotossistemas reflete em decaimento nos valores de Fv/Fm. A produção de xantofilas no estado de de-epoxidação também remete para alta produção de espécies reativas de oxigênio (GOIRIS et al., 2015). Quando analisadas as concentrações dos pigmentos por célula, a diferença da adição do ferro se torna mais clara; novamente o problema de equilibrar crescimento e produção de biomoléculas de interesse. Essa dificuldade ocorre principalmente pelo fato de a produção da maior parte das substâncias de interesse comercial ocorrer quando o cultivo está sob alguma forma de estresse; no entanto isso prejudica a replicação das células e o aumento de biomassa. De maneira geral a adição do ferro no início da fase estacionária prejudica o crescimento, mas estimula a produção de carotenoides como zeaxantina e luteína. O acúmulo de luteína ocorre em maiores quantidades sobre altas concentrações de H^+, como forma de proteção; desta forma o aumento de luteína pode estar relacionado não necessariamente ao uso do ferro como nutriente, mas sim ao baixo pH que o cultivo atingiu. A alta concentração de H^+ também estimula a transformação de violaxantina em anteraxantina e depois para zeaxantina, como forma de proteção (FRANK et al., 1994; NIYOGI; BJÖRKMAN; GROSSMAN, 1997), justificando o aumento desse pigmento também. Isso explica a grande evolução desses pigmentos no tratamento D após a adição do ferro que gerou uma grande queda nos valores de pH. Existe uma forte relação desses fatores com NPQ, de forma que as maiores contribuições para o NPQ são a concentração de prótons na membrana transtilacóide, as concentrações de zeaxantina e anteraxantina e as concentrações de luteína. Isso reflete os resultados de dissipação não fotoquímica encontradas no segundo experimento, onde baixos valores de pH no meio e valores

elevados de zeaxantina e anteraxantina estão relacionados a maiores valores de NPQ. O aumento de cantaxantina foi maior com o meio Conway na concentração celular também; isso está relacionado a três fatores: envelhecimento do cultivo, alta densidade celular e depleção de nitrogênio. No caso deste estudo acredita-se que os principais motivos foram a depleção de nitrogênio e a maior densidade celular encontrada nesses tratamentos (LUBIÁN et al., 2000).

A concentração de ácidos graxos na maioria das réplicas foi muito baixa quando comparado com a literatura. Nesse experimento apenas três réplicas de tratamentos distintos tiveram concentrações perto do esperado para essa espécie, entre 125 $mg.g^{-1}$ PS e 250 $mg.g^{-1}$ PS (POLISHCHUK et al., 2015; WEI; HUANG, 2017). Essa baixa concentração total de ácidos graxos é um indicio de um cultivo em declínio, pois a degradação das células leva a redução das concentrações de ácidos graxos. No entanto os ácidos graxos que foram maioria são os necessários para o uso dessa biomassa para a produção de biocombustíveis, com altas proporção de C16:0, C16:1 e C18:1, nesse sentido a adição de ferro parece ter pouca relevância, com maior relevância para a depleção de nutrientes. O perfil de ácidos graxos observado neste experimento condiz com o observado para condições de depleção de nitrogênio realizado por PAL et al. (2011). As porcentagens desses ácidos graxos de importância para a produção de biocombustível foram mais altas neste experimento do que observado em outros estudos, como por exemplo a indução com depleção de nutrientes e alta luminosidade por SU et al. (2011) que conseguiu um máximo de 70% de SFA+MUFA. Em compensação eles conseguiram entre 25 e 40 % de EPA, bem superior ao encontrado no presente estudo (máximo de 10%). Sukenik et. al (2013) sugere que os ácidos graxos 16:0 e 16:1 são os principais compostos de triglicerídeos enquanto que 20:5 seria predominante nos galactolipídeos. A baixa concentração de EPA encontrada neste experimento é devida à fase em que foi coletada a biomassa, pois de maneira geral a concentração desse ácido graxo costuma diminuir com o envelhecimento da cultura, com maiores concentrações no início da fase estacionária. Outro ponto importante e observado em outros estudos, quanto ao uso de ácidos graxos para produção de biodiesel, é que um dos grandes problemas é conseguir um perfil adequado, com alta proporção de MUFA e SFA, e ao mesmo tempo conseguir uma grande quantidade de concentração total (SU et al., 2011). Como forma de sobreviver a condições de estresse que limitam o crescimento, as microalgas

aumentam a quantidade de produto de reserva ricos em energia quando o fornecimento de carbono excede a capacidade fotossintética das células. Neste caso *N. oculata* acumula TAG como forma de armazenamento de energia, como a falta de nitrogênio e pH muito baixo.

Em condições fisiológicas favoráveis o acúmulo de EPA está associado a composição de estruturas celulares, aumento do volume dos cloroplastos, e aumento de pigmentos fotossintetizantes (PAL et al., 2011). As mudanças geradas por estresse ocorrem simultaneamente no perfil de ácidos graxos e de pigmentos. Em experimento realizado com depleção de nitrogênio foi observado o acúmulo de ácidos graxos totais, mas com um declínio nas concentrações de EPA e de pigmentos captadores de luz, assim como o aumento no ciclo da violaxantina e do NPQ (SOLOVCHENKO et al., 2014). Os baixos valores de EPA podem estar associados a degradação da célula, em especial dos cloroplastos, visto que esse ácido graxo está associado à estrutura dessas organelas, e os resultados sugerem uma degradação do aparato fotossintético, tanto pela redução na concentração de pigmentos como pelos dados da RLC que demonstram um decaimento nos parâmetros da fotossíntese. Os altos valores de NPQ sugerem uma alta ação dos sistemas de dissipação não fotoquímica, coerente com a redução no transporte de elétrons (ETRm) e perda da eficiência geral da fotossíntese, que com menor quantidade de clorofila-a não suporta energia luminosas tão altas. Seguindo este mesmo raciocínio é possível inferir que no décimo quarto dia e início da fase estacionária a concentração de EPA seria mais alta, como indicado pela literatura. Além disso, os tratamentos E e F teriam maiores concentrações desse ácido graxo tão valioso para fins comerciais. Infelizmente, por motivos logísticos não foi possível realizar a avaliação dos ácidos graxos para o dia 14. Seria uma avalição interessante assim como analisar pigmentos e ácidos graxos em períodos mais curtos após a indução de estresse com o ferro. Essa sugestão é baseada no fato da rápida adaptação dessas microalgas, podendo nesse meio tempo ter a produção de certos carotenoides e dos ácidos graxos exacerbados. As microalgas do gênero *Nannochloropsis* costumam habitar regiões costeiras e estuarinas com grandes variações de salinidade, luz e nitrogênio de acordo com as condições ambientais. Desta forma esses organismos tem a capacidade de rápidos e coordenados ajustes metabólicos, tal como acúmulo de metabólitos

osmorregulatórios, redistribuições dos lipídios de reserva e estruturais, e reorganização do aparato fotossintetizante (SOLOVCHENKO et al., 2014).

A adição do ferro desde o início do cultivo no meio de baixo custo trouxe melhorias na produção de clorofila-a e de carotenoides totais, entre os carotenoides os influenciados pela adição do ferro no meio foram vaucheraxantina e zeaxantina. Provavelmente devido ao aumento do estresse oxidativo. A adição de ferro na fase estacionária também gerou grande aumento de zeaxantina no tratamento D, parecendo uma boa tática para a produção desse pigmento de grande importância. Foram obtidas concentrações próximas a 6mg.L^{-1} de chl-a e cerca de 2mg.L^{-1} de carotenoides totais, com altas proporções de zeaxantina, astaxantina e betacaroteno, superiores as encontradas no meio Conway, e superior ao encontrado em outros experimentos: 1.65mg.g^{-1} PS (GOIRIS et al., 2012), Isso indica que a utilização desse meio fertilizante com ferro é uma boa estratégia para uso de interesse comercial, seja na aquicultura ou para formulação de outros produtos. Novamente a concentração máxima para o experimento indica que o melhor momento para coletar a biomassa é no início da fase estacionária, já que para o dia 18 as concentrações foram mais baixas. Os dados de ácidos graxos corroboram com esse argumento, visto que as concentrações de ácidos graxos totais foram baixa comparadas com outros estudos, no entanto o perfil apresentado se mostra favorável a utilização da biomassa para produção de biocombustíveis.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Estudos já demonstram a possibilidade de explorar a produção de pigmentos e de lipídios simultaneamente para *Nannochloropsis oculata* (FERREIRA et al., 2013; NOBRE et al., 2013). Maximizar a produção de ambas as substâncias juntamente com a biomassa ainda é um desafio devido à fisiologia das microalgas.

O primeiro experimento foi exploratório e teve como principal objetivo avaliar como diferentes proporções de nutrientes afetam o perfil pigmentar de *Nannochloropsis oculata*. Houve a depleção de nitrogênio em todos os tratamentos, porém foi mais severo no meio DF. Este efeito juntamente com o estresse salino levou a mortandade de células percebida pela redução da clorofila-a nas análises de HPLC, o que demonstra a eficiência do uso do perfil pigmentar para o acompanhamento da condição fisiológica do cultivo. A utilização de meios de baixo custo para a produção de pigmentos a partir de *Nannochloropsis oculata* se mostrou eficiente. Os meios com dobro de íon amônio demonstraram maior capacidade para a produção de pigmentos de interesse comercial, em especial a zeaxantina e luteína, além de promover crescimento semelhante ao do meio Conway. No entanto, acredita-se que o aumento desses pigmentos está mais relacionado à queda nos valores de pH do que com a fonte de nitrogênio em si. O custo do meio de cultivo para produção de carotenoides foi mais baixo para o tratamento AX, o que o torna o melhor candidato para uma possível produção em escala comercial, e por isso ele foi escolhido como base para o segundo experimento.

O segundo experimento que usou como base os resultados do primeiro experimento, teve como principal objetivo estimular e avaliar a produção de pigmentos e ácidos graxos de interesse comercial em meios com a adição de ferro. Foi utilizado o meio com melhor resultado no experimento um como base. E foram feitas adições de ferro no início do experimento e no início da fase estacionária. De maneira geral, observou-se maior produção de clorofila-*a* e carotenoides totais nos meios com adição de ferro desde o início, mostrando a importância desse elemento para o meio de cultivo para a produção comercial. As concentrações aumentaram até o início da fase estacionária e depois diminuíram, então, o ideal é coletar a biomassa nesse ponto, visto que as concentrações diminuíram para ambos os experimentos após a fase

estacionária. Com a adição de ferro na fase estacionária foi observado um acúmulo de zeaxantina. Além disso foi observado um perfil de ácidos graxos com alta proporção de C16:0, C16:1 e C18:0. Esse perfil é o ideal para o uso da biomassa para a produção de biocombustível. No entanto, a quantidade total de ácidos graxos foi baixa, provavelmente efeito da coleta em uma fase tardia do experimento (dia 18). Devido à grande importância do ferro para a fisiologia das microalgas é indispensável sua utilização em meios de cultivo.

6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

É importante a realização de mais estudos para entender a fisiologia do acúmulo de pigmentos e ácidos graxos de interesse comercial, especialmente em intervalos de tempo mais curtos para melhor compreender o funcionamento da fisiologia das células de *Nannochloropsis oculata*. Outro problema a ser resolvido é maximizar o crescimento com a produção de biomoléculas, o uso do ferro para estímulo da produção de zeaxantina é uma alternativa, porém com necessidade de ajustes quanto a concentração e forma de administrar. Pesquisas a nível molecular e genético são interessantes como forma de possibilitar a engenharia genética de microalgas para a produção dessas substâncias de interesse comercial (AL-HOQANI; YOUNG; PURTON, 2017; LIU; SONG; QIU, 2017).

Além disso, é necessário avaliar o uso e a aplicabilidade dos meios de baixo custo, como os meio com fertilizantes e efluentes de aquicultura, para a produção em escala maiores, e.g. escala piloto ou escala comercial. Ajustes finos podem ser feitos em relação a concentração de nutrientes com o auxílio de ferramentas como o PAM, que são pouco invasivas e possibilitam o monitoramento do cultivo e permitem estabelecer protocolos para fases de crescimento e fases de produção de biomoléculas de interesse comercial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETOLA, T. G. **Effect on nitrogen, iron and temperature on yield and composition of microalgae**. 2011. Oklahoma State University, 2011.

AL-HOQANI, U.; YOUNG, R.; PURTON, S. The biotechnological potential of Nannochloropsis. **Perspectives in Phycology**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2017.

ANANDARAJAH, K.; MAHENDRAPERUMAL, G.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Characterization of microalga Nannochloropsis sp. mutants for improved production of biofuels. **Applied Energy**, v. 96, p. 371–377, 2012.

ANTIA, N. J.; CHENG, J. Y. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. **British Phycological Journal**, v. 17, n. 1, p. 39–50, 1982.

ARRIADA, A. A.; ABREU, P. C. Nannochloropsis Oculata Growth in Produced Water: an Alternative for Massive Microalgae Biomass Production. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 8, n. 3, p. 119–125, 2014.

BAI, M. Der; CHENG, C. H.; WAN, H. M.; LIN, Y. H. Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 5, p. 783–786, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2011.02.003>.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. 2ª ed. Pisa, Italy: Taylor & Francis, 2014.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.

BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga Haematococcus pluvialis: Cellular physiology and stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 2, p. 111–117, 2000.

BOYD, P. W.; LAW, C. S. The Southern Ocean Iron RElease Experiment (SOIREE)—introduction and summary. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 48, p. 2425–2438, 2001.

BOYD, P. W.; STRZEPEK, R.; TAKEDA, S.; JACKSON, G.; WONG, C. S.; MCKAY, R. M.; LAW, C.; KIYOSAWA, H.; SAITO, H.; SHERRY, N.; JOHNSON, K.; GOWER, J.; RAMAIAH, N. The evolution and termination of an iron-induced mesoscale bloom in the northeast subarctic Pacific. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 6, p. 1872–1886, 2005.

BROWN, M. R. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. (L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, N. Simoes, Eds.) In: Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola., Cancún, Quintana Roo, México. **Anais**... Cancún, Quintana Roo, México: 2002.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; CERÓN-GARCÍA, M. C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; CONTRERAS-GÓMEZ, A.; MOLINA-GRIMA, E. A low-cost culture medium for the production of Nannochloropsis gaditana biomass

optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M. A.; CHANG, J. S.; BAI, F.; ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review. **Bioresource Technology**, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2007.

CHO, Y. C.; CHENG, J. H.; HSU, S. L.; HONG, S. E.; LEE, T. M.; CHANG, C. M. J. Supercritical carbon dioxide anti-solvent precipitation of anti-oxidative zeaxanthin highly recovered by elution chromatography from Nannochloropsis oculata. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 3, p. 274–280, 2011.

CHO, Y. C.; WANG, Y. C.; SHIEH, C. J.; LIN, J. C. Te; CHANG, C. M. J.; HAN, E. Countercurrent flow of supercritical anti-solvent in the production of pure xanthophylls from Nannochloropsis oculata. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 85–91, 2012.

COLLOS, Y. Nitrate uptake , nitrite release and uptake , and new production estimates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 171, p. 293–301, 1998.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146–1151, 2009.

CRAMPON, C.; MOUAHID, A.; TOUDJI, S. A. A.; LEṔINE, O.; BADENS, E. Influence of pretreatment on supercritical CO2 extraction from Nannochloropsis oculata. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 79, p. 337–344, 2013.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, A. M. M. B.; DE MORAIS, R. M. S. C. Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5128–5155, 2015.

DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163–1174, 2007.

DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 51–59, 2000.

ENCARNACAO, T.; BURROWS, H. D.; PAIS, A. C.; CAMPOS, M. G.; KREMER, A. Effect of N and P on the Uptake of Magnesium and Iron and on the Production of Carotenoids and Chlorophyll by the Microalgae. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, p. 824–832, 2012.

FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, L. A.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; NOBRE, B. P.; PALAVRA, A. M. F.; DA SILVA, P. P.; GOUVEIA, L.; SILVA, C. A biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga - Energy and CO2 emission and economic analyses. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 235–244, 2013.

FORJÁN, E.; GARBAYO, I.; CASAL, C.; VÍLCHEZ, C.; FORJÁN LOZANO, E.; GARBAYO NORES, I.; CASAL BEJARANO, C.; VÍLCHEZ LOBATO, C.; FORJÁN, E.; GARBAYO, I.; CASAL, C.; VÍLCHEZ, C. Enhancement of carotenoid production in Nannochloropsis by phosphate and sulphur limitation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. 1, p. 356–364, 2007.

FRANK, H. A.; CUA, A.; CHYNWAT, V.; YOUNG, A.; GOSZTOLA, D.; WASIELEWSKI, M. R. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. **Photosynthesis Research**, v. 41, n. 3, p. 389–395, 1994.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484–491, 2013.

GEIDER, R. J.; LA ROCHE, J. The role of iron in phytoplankton photosynthesis, and the potential for iron-limitation of primary productivity in the sea. **Photosynthesis Research**, v. 39, n. 3, p. 275–301, 1994.

GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; DE BRABANTER, J.; DE COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1477–1486, 2012.

GOIRIS, K.; VAN COLEN, W.; WILCHES, I.; LEÓN-TAMARIZ, F.; DE COOMAN, L.; MUYLAERT, K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. **Algal Research**, v. 7, n. November, p. 51–57, 2015.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016.

GOUVEIA, L. From Tiny Microalgae to Huge Biorefineries. **Oceanography: Open Access**, v. 02, n. 01, p. 2–9, 2014.

GOUVEIA, L.; VELOSO, V.; REIS, A.; FERNANDES, H.; NOVAIS, J.; EMPIS, J. Evolution of pigment composition in Chlorella vulgaris. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 2, p. 157–163, 1996.

GU, N.; LIN, Q.; LI, G.; QIN, G.; LIN, J.; HUANG, L. Effect of Salinity Change on Biomass and Biochemical Composition of Nannochloropsis oculata. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 1, p. 97–106, 2012.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 625–644, 2011.

HÄUBNER, N.; SYLVANDER, P.; VUORI, K.; SNOEIJS, P. Abiotic stress modifies the synthesis of alpha-tocopherol and beta-carotene in phytoplankton species. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 4, p. 753–759, 2014.

HODGSON, P. A.; HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R.; LEFTLEY, J. W. Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) during batch culture - I. The growth cycle. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 2, p. 169–181, 1991.

HUANG, X.; WEI, L.; HUANG, Z.; YAN, J. Effect of high ferric ion concentrations on

total lipids and lipid characteristics of Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata and Pavlova viridis. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 105–114, 2014.

JUNEAU, P.; GREEN, B. R.; HARRISON, P. J. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. **Photosynthetica**, v. 43, n. 1, p. 75–83, 2005.

KANDILIAN, R.; LEE, E.; PILON, L. Radiation and optical properties of Nannochloropsis oculata grown under different irradiances and spectra. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 63–73, 2013.

KANDILIAN, R.; PRUVOST, J.; LEGRAND, J.; PILON, L. Influence of light absorption rate by Nannochloropsis oculata on triglyceride production during nitrogen starvation. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 308–319, 2014.

KIM, S. K.; RAVICHANDRAN, Y. D.; KHAN, S. B.; KIM, Y. T. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 5, p. 511–523, 2008.

KOSAKOWSKA, A.; LEWANDOWSKA, J.; STOŃ, J.; BURKIEWICZ, K. Qualitative and quantitative composition of pigments in Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) stressed by iron. **BioMetals**, v. 17, n. 1, p. 45–52, 2004.

KROMKAMP, J.; PEENE, J. Estimation of phytoplankton photosynthesis and nutrient limitation in the Eastern Scheldt estuary using variable fluorescence. **Aquatic Ecology**, v. 33, n. 1, p. 101–104, 1999.

LEEUWE, M. a Van; STEFELS, J. Effects of Iron and Light Stress on the Biochemical Composition of. **Journal of Phycology**, v. 503, p. 496–503, 1998.

LI, J.; HAN, D.; WANG, D.; NING, K.; JIA, J.; WEI, L.; JING, X.; HUANG, S.; CHEN, J.; LI, Y.; HU, Q.; XU, J. Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of Nannochloropsis Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. **The Plant cell**, v. 26, n. 4, p. 1645–1665, 2014.

LI, X. P.; BJÖRKMAN, O.; SHIH, C.; GROSSMAN, A. R.; ROSENQUIST, M.; JANSSON, S.; NIYOGI, K. K. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 391–5, 2000.

LIAU, B. C.; SHEN, C. T.; LIANG, F. P.; HONG, S. E.; HSU, S. L.; JONG, T. T.; CHANG, C. M. J. Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 169–175, 2010.

LIU, J.; BANGERT, K. Effect of Nitrogen Source in Low-Cost Media on Biomass and Lipid Productivity of Nannochloropsis salina for Large-Scale Biodiesel Production. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2014.

LIU, J.; SONG, Y.; QIU, W. Oleaginous microalgae Nannochloropsis as a new model for biofuel production : Review & analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, n. May 2016, p. 154–162, 2017.

LOHR, M. Chapter 3: Carotenoid metabolism in phytoplankton. In: **Phytoplankton**

Pigments - Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography. [s.l: s.n.]p. 113–164.

LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O.; MORENO-GARRIDO, I.; HUERTAS, I. E.; SOBRINO, C.; GONZÁLEZ-DEL VALLE, M.; PARES, G. Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 249–255, 2000.

MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. Water analyses. **J Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 36, p. 120, 1978.

MAEDA, Y.; YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, T. ScienceDirect Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 111–120, 2018.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013.

MARTIN, J. H.; COALE, K. H.; JOHNSON, K. S.; FITZWATER, S. E.; GORDON, R. M.; TANNER, S. J.; HUNTER, C. N.; ELROD, V. A.; NOWICKI, J. L.; COLEY, T. L.; BARBER, R. T.; LINDLEY, S.; WATSON, A. J.; VAN SCOY, K.; LAW, C. S.; LIDDICOAT, M. I.; LING, R.; STANTON, T.; STOCKEL, J.; COLLINS, C.; ANDERSON, A.; BIDIGARE, R.; ONDRUSEK, M.; LATASA, M.; MILLERO, F. J.; LEE, K.; YAO, W.; ZHANG, J. Z.; FRIEDERICH, G.; SAKAMOTO, C.; CHAVEZ, F.; BUCK, K.; KOLBER, Z.; GREENE, R.; FALKOWSKI, P.; CHISHOLM, S. W.; HOGE, F.; SWIFT, R.; YUNGEL, J.; TURNER, S.; NIGHTINGALE, P.; HATTON, A.; LISS, P.; TINDALE, N. W. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. **Nature**, v. 371, n. 6493, p. 123–129, 1994.

MARTÍNEZ-ROLDÁN, A. J.; PERALES-VELA, H. V.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; TORZILLO, G. Physiological response of Nannochloropsis sp. to saline stress in laboratory batch cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 115–121, 2014.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOPECKÝ, J.; KOBLÍŽEK, M.; NIDIACI, L.; KOMENDA, J.; LUKAVSKÁ, A.; SACCHI, A. Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga Chlorococcum sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3/5, p. 417–426, 2000.

MATOS, Â. P.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil. **Algal Research**, v. 24, p. 505–508, 2017.

MAYERS, J. J.; FLYNN, K. J.; SHIELDS, R. J. Influence of the N: P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of Nannochloropsis sp. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 588–595, 2014.

MENZYANOVA, N. G.; GOLTVYANSKY, A. V.; KUZNETSOVA, Y. A.; SYSENKO, E. I. Season variability of iron effects on periodic culture of microalgae Dunaliella viridis Teod. **Frontiers of Biology in China**, v. 4, n. 3, p. 328–336, 2009.

MOAZAMI, N.; ASHORI, A.; RANJBAR, R.; TANGESTANI, M. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of Nannochloropsis. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 449–453, 2012.

MOJAAT, M.; PRUVOST, J.; FOUCAULT, A.; LEGRAND, J. Effect of organic carbon sources and Fe2+ ions on growth and beta-carotene accumulation by Dunaliella salina. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 177–184, 2008.

MOURENTE, G.; LUBIÁN, L. M.; ODRIOZOLA, J. M. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. **Hydrobiologia**, v. 203, p. 147–154, 1990.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease Effects on Risk Factors , Molecular Pathways , and Clinical Events. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 20, p. 2047–67, 2011.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; DE SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; DE CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013.

NIYOGI, K. K.; BJÖRKMAN, O.; GROSSMAN, a R. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14162–14167, 1997.

NOBRE, B. P.; VILLALOBOS, F.; BARRAGÁN, B. E.; OLIVEIRA, A. C.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; MENDES, R. L.; SOVOVÁ, H.; PALAVRA, A. F.; GOUVEIA, L. A biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga - Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 128–136, 2013.

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 553–556, 2000.

OWENS, T. G.; GALLAGHER, J. C.; ALBERTE, R. S. Photosynthetic Light-Harvesting Function of Violaxanthin in Nannochloropsis Spp. (Eustigmatophyceae). **Journal of Phycology**, v. 23, p. 79–85, 1987.

PAL, D.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by Nannochloropsis sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1429–1441, 2011.

PASQUET, V.; MORISSET, P.; IHAMMOUINE, S.; CHEPIED, A.; AUMAILLEY, L.; BERARD, J. B.; SERIVE, B.; KAAS, R.; LANNELUC, I.; THIERY, V.; LAFFERRIERE, M.; PIOT, J. M.; PATRICE, T.; CADORET, J. P.; PICOT, L. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of Dunaliella tertiolecta extracts. **Marine Drugs**, v. 9, n. 5, p. 819–831, 2011.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 781–796, 2013.

PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. Photoinibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research (USA)**, v. 38, p. 687–701, 1980.

POLISHCHUK, A.; VALEV, D.; TARVAINEN, M.; MISHRA, S.; KINNUNEN, V.; ANTAL, T.; YANG, B.; RINTALA, J.; TYYSTJ??RVI, E. Cultivation of Nannochloropsis for eicosapentaenoic acid production in wastewaters of pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 469–476, 2015.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O-2-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, n. 2–3, p. 111–149, 1999.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

REBOLLOSO-FUENTES, M. M.; NAVARRO-PÉREZ, a.; GARCÍA-CAMACHO, F.; RAMOS-MIRAS, J. J.; GUIL-GUERRERO, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga Nannochloropsis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2966–2972, 2001.

RENAUD, S. M.; PARRY, D. L.; THINH, L. Van; KUO, C.; PADOVAN, A.; SAMMY, N. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of Isochrysis sp. and Nannochloropsis oculata for use in tropical aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 1, p. 43–53, 1991.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.

SALES, R.; ABREU, P. C. Use of Natural pH Variation to Increase the Flocculation of the Marine Microalgae Nannochloropsis oculata. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 2012–2019, 2014.

SCHREIBER, U.; MÜLLER, J. F.; HAUGG, A.; GADEMANN, R. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. **Photosynthesis Research**, v. 74, n. 3, p. 317–330, 2002.

SHEN, C. T.; CHEN, P. Y.; WU, J. J.; LEE, T. M.; HSU, S. L.; CHANG, C. M. J.; YOUNG, C. C.; SHIEH, C. J. Purification of algal anti-tyrosinase zeaxanthin from Nannochloropsis oculata using supercritical anti-solvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 955–962, 2011.

SOLOVCHENKO, A. E. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 437–449, 2015.

SOLOVCHENKO, A.; LUKYANOV, A.; SOLOVCHENKO, O.; DIDI-COHEN, S.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I. Interactive effects of salinity, high light, and

nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in Nannochloropsis oceanica CCALA 804. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 5, p. 635–644, 2014.

SOLOVCHENKO, A.; NEVEROV, K. Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. **Photosynthesis Research**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2017.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006a.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Optimization of Nannochloropsis oculata growth using the response surface method. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 1049–1056, 2006b.

STANSELL, G. R.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Microalgal fatty acid composition: Implications for biodiesel quality. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 791–801, 2012.

STEINRÜCKEN, P.; ERGA, S. R.; MJØS, S. A.; KLEIVDAL, H.; PRESTEGARD, S. K. Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. **Algal Research**, v. 26, p. 392–401, 2017.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**. 2ª ed. Ottawa, Canada: Fisheries Research Board of Canada, 1972.

SU, C. H.; CHIEN, L. J.; GOMES, J.; LIN, Y. S.; YU, Y. K.; LIOU, J. S.; SYU, R. J. Factors affecting lipid accumulation by Nannochloropsis oculata in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 903–908, 2011.

SUGGETT, D. J.; BOROWITZKA, M. a.; PRÁŠIL, O. Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. **Developments in Applied Phycology 4**, p. 1–18, 2011.

SUKENIK, A.; SCHNEIDER, J. C.; ROESSLER, P. G.; LIVNE, A.; BERNER, T.; KOLBER, Z.; WYMAN, K.; PRASIL, O.; FALKOWSKI, P. G. Photosynthetic characterization of a mutant of nannochloropsis deficient in the synthesis of eicosapentaenoic acid. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 46, n. 2, p. 101–108, 1998.

SUKENIK, A.; ZMORA, O.; CARMELI, Y. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. Nannochloropsis sp. **Aquaculture**, v. 117, n. 3–4, p. 313–326, 1993.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing.R Foundation for Statistical Computing**Vienna, Austria, 2015. .

UGGETTI, E.; SIALVE, B.; TRABLY, E.; STEYER, J.-P. Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefi nery approach. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, p. 516–529, 2014.

VADIVELOO, A.; MOHEIMANI, N. R.; COSGROVE, J. J.; PARLEVLIET, D.; BAHRI, P. A. Effects of different light spectra on the growth, productivity and photosynthesis of

two acclimated strains of Nannochloropsis sp. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–10, 2017.

VAN VOOREN, G.; LE GRAND, F.; LEGRAND, J.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; PRUVOST, J. Investigation of fatty acids accumulation in Nannochloropsis oculata for biodiesel application. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 421–432, 2012.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. a. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 789–807, 2011.

VOLKMAN, J. K.; BROWN, M. R.; DUNSTAN, G. a; JEFFREY, S. W. the Biochemical-Composition of Marine Microalgae From the Class Eustigmatophyceae. **Journal of Phycology**, v. 29, n. October, p. 69–78, 1993.

WALNE, P. R. Experiments on the large-scale culture of the larvae of Ostrea edulis. **Fishery Investigation**, v. 2, n. 25, p. 53, 1966.

WANG, H.; GAO, L.; CHEN, L.; GUO, F.; LIU, T. Integration process of biodiesel production from filamentous oleaginous microalgae Tribonema minus. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 39–44, 2013.

WEI, L.; HUANG, X. Long-duration effect of multi-factor stresses on the cellular biochemistry, oil-yielding performance and morphology of Nannochloropsis oculata. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2017.

WEI, L.; HUANG, X.; HUANG, Z.; ZHOU, Z. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in Nannochloropsis oculata for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 534–538, 2013.

WHITE, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1675–1682, 2011.

YAMASHITA, C.; MAGALHAES, P. M. da S. Metodos simples para o cultivo da alga Tetraselmis chuii. **Boletim de Pesquisa - Empresa de Pesquisa Agropecuaria do Rio Grande do Norte S.A. (Brazil).**, v. 8, p. 21, 1984.

YOUNG, E. B.; BEARDALL, J. Modulation of photosynthesis and inorganic carbon acquisition in a marine microalga by nitrogen, iron, and light availability. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p. 917–928, 2005.

ZAPATA, M.; RODRÍGUEZ, F.; GARRIDO, J. L. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. **Marine Ecology Progress Series**, v. 195, p. 29–45, 2000.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th. ed. Upper Saldle River. New Jersey: Prentice Hall, 2010.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 2, p. 189–194, 1997.

ZHU, Y.; DUNFORD, N. T. Growth and biomass characteristics of Picochlorum

oklahomensis and Nannochloropsis oculata. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 6, p. 841–849, 2013.